



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

RENATA FERREIRA COLLI BADINI

**PRODUÇÃO DE NATTO EM PÓ POR FERMENTAÇÃO DE  
GRÃOS DE SOJA CULTIVAR BRS 216 COM *Bacillus subtilis***

**Natto**

---

Londrina  
2013

RENATA FERREIRA COLLI BADINI

**PRODUÇÃO DE NATTO EM PÓ POR FERMENTAÇÃO DE  
GRÃOS DE SOJA CULTIVAR BRS 216 COM *Bacillus subtilis***

**Natto**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito à obtenção do título de Mestre.

Orientadora: Profa. Dra. Mara Lucia Luiz Ribeiro

Londrina  
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

B136p Badini, Renata Ferreira Colli.

Produção de natto em pó por fermentação de grãos de soja cultivar BRS 216 com *Bacillus subtilis* Natto / Renata Ferreira Colli Badini. – Londrina, 2013.  
100 f. : il.

Orientador: Mara Lucia Luiz Ribeiro.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) □ Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2013.

Inclui bibliografia.

1. Soja – Processamento – Teses. 2. Soja – Antioxidantes – Teses. 3. Soja – Fermentação – Teses. 4. *Bacillus subtilis* – Teses. 5. Isoflavonas – Teses. I. Ribeiro, Mara Lucia Luiz. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Exatas. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia. III. Título.

CDU 664.6/.7

RENATA FERREIRA COLLI BADINI

**PRODUÇÃO DE NATTO EM PÓ POR FERMENTAÇÃO DE GRÃOS DE  
SOJA CULTIVAR BRS 216 COM *Bacillus subtilis* Natto**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina como requisito à obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Mara Lucia Luiz Ribeiro  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof. Dra. Sandra Regina Georgetti  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Dra. Josemeyre Bonifácio da Silva  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 20 de maio de 2013.

À Deus por me guiar nos caminhos da  
vida e à minha família por caminhar  
ao meu lado.

## AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Mara Lucia L. Ribeiro por todas as orientações e explicações essenciais.

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Profa. Dra. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi pela doação da cepa de *Bacillus subtilis* Natto para a execução deste trabalho.

À EMBRAPA – Soja, Londrina, em nome do mestre José Marcos G. Mandarino pelo fornecimento da amostra de soja utilizada neste trabalho.

Ao Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, em nome da Profa. Dra. Elza Iouko Ida e Dra. Josemeyre Bonifácio da Silva pelas análises de isoflavonas nas amostras.

Aos docentes do Programa de Mestrado em Biotecnologia que contribuíram para meu desenvolvimento acadêmico.

Ao suporte indispensável do técnico de laboratório Nelson Janeiro Rodriguez durante os experimentos.

À minha família e meu namorado pelo apoio, compreensão e carinho.

À todos que apoiaram e colaboraram para a realização deste trabalho.

BADINI, Renata Ferreira Colli. **Produção de natto em pó por fermentação de grãos de soja cultivar BRS 216 com Bacillus subtilis Natto**. 2013. 100 f. Dissertação, Mestrado em Biotecnologia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

## RESUMO

O Natto é um alimento obtido pela fermentação de grãos de soja pela bactéria *Bacillus subtilis* Natto. Por ser um alimento de soja agrega suas características, alto teor de proteínas, vitaminas, minerais e fibras, e devido a fermentação também apresenta melhor digestibilidade, diminuição de compostos causadores da flatulência, enriquecimento com compostos funcionais, além de proporcionar sabor e aroma únicos. Porém, suas características visuais diminuem sua aceitação. O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito das diferentes quantidades de inóculo adicionadas, temperatura e tempo de fermentação utilizando um Delineamento Composto Central (23) com três repetições do ponto central, totalizando 17 ensaios. Os grãos de soja foram inoculados com  $10^3$  –  $10^9$  UFC/mL, as temperaturas de 25 – 45o C e fermentadas de 12 – 36 h. Os nattos elaborados conforme o DCC foram avaliados quanto ao teor de isoflavonas agliconas, atividade antioxidante e atividade de  $\beta$ -glicosidase. O maior valor de atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase foi de 0,008 U/g a  $10^9$  UFC/mL, 35° C e 24 h de incubação, para a atividade antioxidante o maior valor foi de 1,23  $\mu$ M Trolox/g em base seca obtidos com  $10^9$  UFC/mL a 45° C e 36 h de incubação e para o teor de isoflavonas agliconas foi de 33,34 mg/100g com  $10^3$  UFC/mL, 25° C e 12 h de incubação. Foi determinado pontos ótimos para a produção de dois Nattos um com elevado teor de isoflavonas agliconas e outro com elevada atividade antioxidante. O Natto enriquecido com isoflavonas agliconas foi preparado com  $10^3$  UFC/mL a 25° C e 12 h de incubação, liofilizado e apresentou 64,20% de umidade, 11,30  $\mu$ g/g de açúcares totais, 18,95% de proteína, 11,78% de lipídeo, 1,43% de cinzas e 67,84% de carboidratos totais. Também foi determinada a atividade de 0,14 U/g de protease, 13,06 U/g de lipase e 0,44 U/g de celulase no produto enriquecido. O Natto enriquecido com atividade antioxidante foi preparado com  $10^9$  UFC/mL a 45° C e 20 h de incubação, liofilizado e apresentou 62,45% de umidade, 9,29  $\mu$ g/g de açúcares totais, 17,54% de proteína, 10,48% de lipídeo, 4,57% de cinzas e 67,40% de carboidratos totais. Também foi determinada a atividade de 0,16 U/g de protease, 14,53 U/g de lipase e 0,32 U/g de celulase no Natto enriquecido. Por meio da análise dos gráficos de superfície de resposta e do gráfico de valores preditos e desejabilidade foi possível obter as melhores condições de fermentação para obtenção de nattos com alto teor dos compostos desejados. A análise da composição centesimal e atividade enzimática nos natto otimizados mostrou um alimento proteico revelando um forte potencial funcional por agregar os benefícios nutricionais da soja com a vantagem de ser um produto fermentado.

**Palavras-chave:** Natto. Fermentação. Soja. Isoflavonas agliconas. Atividade antioxidante.

BADINI, Renata Ferreira Colli. **Production of natto powder by fermentation of soybean grain cultivar BRS 216 with Bacillus subtilis Natto**. 2013. 100 p. Dissertação, Mestrado em Biotecnologia – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

### ABSTRACT

The Natto is a food obtained from the fermentation of the soybean grains with the bacterium *Bacillus subtilis* Natto. Because it is a soy food aggregates its characteristics, high protein, vitamins, minerals and fibers, and due to fermentation also provides better digestibility, reduces compounds that cause flatulence, functional compounds enrichment, and provide unique flavor and aroma. However, its sensory characteristics minimize the acceptability. This study aimed to investigate the effect of different amounts of inoculum added, temperature and fermentation time using a Central Composite Design (23) with three replications of the central point, totaling 17 trials. The soybeans were inoculated with 103 - 109 CFU/ml, temperature of 25 - 45° C and fermented 12 - 36 h. The nattos elaborate as described by DCC were evaluated for the content of isoflavone aglycones, antioxidant activity and  $\beta$ -glucosidase activity. The highest activity of the  $\beta$ -glucosidase enzyme was 0.008 U/g into 109 CFU/ml at 35° C and 24 h of incubation, the highest antioxidant activity was 1.23  $\mu$ M Trolox/g dry weight obtained with 109 CFU/mL at 45° C and 36 h of incubation and the content of isoflavone aglycones was 33.34 mg/100g to 103 CFU/ml, 25° C and 12 h incubation. It was determined optimal points to produce two Nattos one with high content isoflavone aglycones and another with high antioxidant activity. The Natto enriched with isoflavone aglycone was prepared with 103 CFU/mL at 25° C and 12 h of incubation, lyophilized and showed 64.20% moisture, 11.30  $\mu$ g/g of total sugars, 18.95% protein, 11.78% lipid, 1.43% ash and 67.84% of total carbohydrates. It was also determined the activity of 0.14 U/g of protease 13.06 U/g lipase and 0.44 U/g of cellulase in the enriched product. The Natto enriched with antioxidant activity was prepared with 109 CFU/mL at 45° C and 20 h of incubation, lyophilized and showed 62.45% moisture, 9.29  $\mu$ g/g of total sugars, 17.54% protein, 10.48% lipid, 4.57 % ash and 67.40% of total carbohydrates. It was also determined the activity of 0.16 U/g of protease, 14.53 U/g lipase and 0.32 U/g of cellulase enriched in Natto. Through analysis of response surface graphs and of predicted values and desirability graph was possible to obtain the best fermentation conditions for obtaining nattos with high concentrations of the desired compounds. The analysis of the composition and enzymatic activity in natto optimized showed a food protein revealed a strong functional potential by adding the nutritional benefits of soy with the advantage of being a fermented product.

**Key words:** Natto. Fermentation. Soybeans. Isoflavones aglycones. Antioxidant activity.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> – Estrutura química das isoflavonas agliconas (a) e glicosiladas (b).....	17
<b>Figura 2</b> – Crescimento mundial do consumo de soja na alimentação humana de 1982 a 2012 .....	21
<b>Figura 3</b> – Forma de comercialização do natto em Londrina – PR .....	29
<b>Figura 4</b> – Grãos de soja cultivar BRS 216 .....	34
 <b>Artigo 1: Influência das condições de fermentação de grãos de soja cultivar BRS 216 com <i>Bacillus subtilis</i> Natto nas características físicas do natto</b>	
<b>Figura 1</b> – Natto obtido após 12 h de fermentação a 25° C com 10 <sup>3</sup> UFC/mL (A) e 10 <sup>9</sup> UFC/mL (B) .....	49
<b>Figura 2</b> – Natto obtido após 36 h de fermentação a 25° C com 10 <sup>3</sup> UFC/mL (A) e 10 <sup>9</sup> UFC/mL (B); e após 24 h de fermentação com 10 <sup>6</sup> UFC/mL (C) .....	49
<b>Figura 3</b> – Natto obtido a 35° C após 24 h de fermentação com 10 <sup>3</sup> UFC/mL (A), 10 <sup>6</sup> UFC/mL (B) 10 <sup>9</sup> UFC/mL (C).....	50
<b>Figura 4</b> – Natto obtido a 45° C após 24 h de fermentação com 10 <sup>6</sup> UFC/mL.....	50
<b>Figura 5</b> – Comparação entre a soja cozida não inoculada (controle 1) (A) e o natto 8, fermentado a 45° C por 36 h com 10 <sup>9</sup> UFC/mL (B).....	51
 <b>Artigo 2: Produção de Natto em Pó com elevado teor de isoflavonas agliconas por Fermentação de Grãos de Soja com <i>Bacillus subtilis</i> Natto</b>	
<b>Figura 1</b> – Superfície de resposta para efeito da concentração de inóculo (UFC/mL) e temperatura (o C) no teor de isoflavonas agliconas presente no natto.....	60
<b>Figura 2</b> – Superfície de resposta para efeito da concentração de inóculo (UFC/mL) e tempo de fermentação (h) no teor de isoflavonas agliconas presente no natto.....	60

<b>Figura 3</b> – Superfície de resposta para efeito da temperatura (o C) e do tempo de fermentação (h) no teor de isoflavonas agliconas presente no natto .....	61
<b>Figura 4</b> – Gráfico do perfil desejável para a produção de natto com elevado teor de isoflavonas agliconas .....	61

**Artigo 3: Otimização da Produção de Natto em Pó com Elevada Atividade Antioxidante**

<b>Figura 1</b> – Superfície de resposta para efeito da concentração de inóculo (UFC/mL) e temperatura (o C) na atividade antioxidante presente no natto .....	70
<b>Figura 2</b> – Superfície de resposta para efeito da concentração de inóculo (UFC/mL) e tempo (h) na atividade antioxidante presente no natto .....	70
<b>Figura 3</b> – Superfície de resposta para efeito da temperatura (o C) e do tempo (h) na atividade antioxidante presente no natto .....	70
<b>Figura 4</b> – Gráfico do perfil desejável para a produção de natto com elevada atividade antioxidante.....	71

**Artigo 4: Efeito das condições de fermentação na produção de natto em enzimas com atividade de  $\beta$ -glicosidase**

<b>Figura 1</b> – Superfície de resposta para efeito da concentração de inóculo (UFC/mL) e temperatura (o C) na atividade de $\beta$ -glicosidase de enzima presente no natto .....	80
<b>Figura 2</b> – Superfície de resposta para efeito da concentração de inóculo (UFC/mL) e tempo (h) na atividade de $\beta$ -glicosidase de enzima presente no natto.....	80
<b>Figura 3</b> – Superfície de resposta para efeito da temperatura (o C) e do tempo (h) na atividade de $\beta$ -glicosidase de enzima presente no natto .....	81
<b>Figura 4</b> – Gráfico do perfil desejável para a produção de natto com elevada atividade de $\beta$ -glicosidase .....	81

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Matriz do delineamento composto central utilizado para a fermentação da soja com <i>B. subtilis</i> Natto .....	37
<b>Tabela 2</b> – Níveis das variáveis independentes para o preparo do natto utilizando o DCC ( $2^3$ ).....	37
 <b>Artigo 1: Influência das condições de fermentação de grãos de soja cultivar BRS 216 com <i>Bacillus subtilis</i> Natto nas características físicas do natto</b>	
<b>Tabela 1</b> – Níveis codificados e reais das variáveis independentes testadas utilizando DCC ( $2^3$ ).....	48
<b>Tabela 2</b> – Valores médios de dureza determinados nas amostras de soja cozida.....	49
 <b>Artigo 2: Produção de Natto em Pó com elevado teor de isoflavonas agliconas por Fermentação de Grãos de Soja com <i>Bacillus subtilis</i> Natto</b>	
<b>Tabela 1</b> – Matriz dos ensaios do delineamento composto central (DCC) com as variáveis independentes e resposta experimental para otimização na produção de natto com elevado teor de isoflavonas agliconas .....	59
<b>Tabela 2</b> – Análise de variância (ANOVA) da otimização da produção do natto com elevado teor de isoflavonas agliconas .....	59
<b>Tabela 3</b> – Composição centesimal do natto produzido em condições otimizadas .....	62
<b>Tabela 4</b> – Análise de enzimas do natto em pó produzido em condições .....	62
 <b>Artigo 3: Otimização da Produção de Natto em Pó com Elevada Atividade Antioxidante</b>	
<b>Tabela 1</b> – Matriz dos ensaios do delineamento composto central (DCC) com as variáveis independentes e resposta experimental para otimização na produção de natto com elevada atividade antioxidante .....	69

<b>Tabela 2</b> – Análise de variância (ANOVA) da otimização da produção do natto com elevada atividade antioxidante .....	69
<b>Tabela 3</b> – Composição centesimal dos Nattos produzidos em condições otimizadas .....	71
<b>Tabela 4</b> – Análise enzimática do natto em pó produzido em condições otimizadas .....	72

**Artigo 4: Efeito das condições de fermentação na produção de natto em enzimas com atividade de  $\beta$ -glicosidase**

<b>Tabela 1</b> – Valores observados e preditos da atividade de $\beta$ -glicosidase nos nattos produzidos .....	79
<b>Tabela 2</b> – Análise de variância (ANOVA) da atividade de $\beta$ -glicosidase para a otimização da produção do natto .....	79

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>15</b>
2.1	Aspectos Gerais da Soja	15
2.2	Princípios da Fermentação	19
2.3	Alimentos Fermentados de Soja	20
2.4	Natto	25
2.4.1	Tipos de Natto	26
2.4.2	Produção do Natto	26
2.4.3	Características Bioquímicas do Natto	29
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>33</b>
3.1	Objetivo Geral	33
3.2	Objetivos Específicos	33
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	<b>34</b>
4.1	Materiais	34
4.1.1	Matéria-prima	34
4.1.2	Microrganismo	34
4.1.3	Reagentes	35
4.2	Métodos	35
4.2.1	Produção do Natto	35
4.2.1.1	Preparo do Inóculo	35
4.2.1.2	Teste de Dureza nos Grãos Cozidos	35
4.2.1.3	Preparo dos Grãos de Soja para a Fermentação	36
4.2.1.4	Fermentação dos Grãos de Soja para a Produção do Natto	36
4.2.2	Delineamento Experimental e Análises Estatísticas	36
4.2.3	Validação do Modelo Matemático e Produção de Natto em Pó	38
4.2.4	Métodos Analítico	38
4.2.4.1	Determinação da Composição Centesimal	38
4.2.4.2	Determinação de Açúcares Totais	39

4.2.4.3	Determinação do Teor de Isoflavonas .....	39
4.2.4.4	Determinação de Atividade Antioxidante .....	40
4.2.4.5	Determinação de Atividade Enzimática .....	41
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>44</b>
5.1	Artigo Científico 1: Influência das condições de fermentação de grãos de soja cultivar BRS 216 com <i>Bacillus subtilis</i> Natto nas características físicas do natto .....	45
5.2	Artigo Científico 2: Produção de Natto em Pó com elevado teor de isoflavonas agliconas por Fermentação de Grãos de Soja com <i>Bacillus subtilis</i> Natto, Food and Bioprocess Technology .....	54
5.3	Artigo Científico 3: Otimização da Produção de Natto em Pó com Elevada Atividade Antioxidante, International Journal of Food Microbiology .....	65
5.4	Artigo Científico 4: Efeito das condições de fermentação na produção de natto em enzimas com atividade de $\beta$ -glicosidase .....	75
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>84</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>85</b>
	<b>ANEXOS .....</b>	<b>99</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Alimentos fermentados são consumidos no mundo desde os tempos mais remotos. Na indústria de alimentos o processo fermentativo mostra-se útil não apenas por gerar novos produtos, mas também por agregar sabor e aroma e em alguns casos enriquecê-los com compostos funcionais.

O natto é um alimento típico oriental composto por grãos de soja fermentados. Apresenta sabor adstringente e um odor característico assim como uma textura viscosa que recobre os grãos. Sua origem é datada há mais de 1000 anos e não é definida geograficamente. É um prato muito apreciado no Japão e produtos semelhantes são conhecidos na China, Índia e Filipinas, o que indica sua possível origem. É consumido puro ou acompanhado de arroz, cebolinha e molho de soja, sendo servido até mesmo na forma de doce.

Acredita-se que foi produzido pela primeira vez armazenando-se grãos de soja cozidos em palha de arroz, que só foi aberta após alguns dias, sendo neste período processada a fermentação por meio de microrganismos existentes naturalmente na palha. Atualmente a produção de natto é industrializada com a adição controlada de bactérias da espécie de *Bacillus sp.*

O natto é considerado uma excelente fonte de proteínas e o teor de lipídeo se mantém próximo à forma *in natura*, assim como os de ácidos graxos livres, muito importantes para a formação do sabor característico.

O processo de fermentação dos grãos de soja altera a forma ou concentração de vários compostos da soja, alguns de maneira benéfica, como as isoflavonas. As isoflavonas são fitoestrógenos presentes em vegetais, têm estrutura e função similar ao estrogênio humano e são encontrados em abundância em grãos de soja. A ação das enzimas produzidas pelos microrganismos promovem a biotransformação das isoflavonas glicosiladas nas formas agliconas, que apresentam efeitos benéficos à saúde, e são mais facilmente absorvidas no trato intestinal humano. As enzimas produzidas durante a fermentação também são importantes, como por exemplo, a nattokinase que apresenta atividade fibrinolítica e ajuda a dissolver coágulos sanguíneos, prevenindo ataques cardíacos.

O natto também é rico em vitaminas K<sub>2</sub>, E e do complexo B, que diminuem os sintomas da osteoporose e do envelhecimento, e aumentam a absorção de nutrientes, respectivamente.

Entretanto, suas características sensoriais diminuem sua aceitação para o paladar dos ocidentais. A produção do natto na forma de pó elimina essa barreira e também facilita o transporte para distribuição comercial; elimina a necessidade de refrigeração em seu armazenamento; aumenta o prazo de validade e sua versatilidade podendo ser usado na formulação de outros produtos.

Pesquisas sobre o natto ainda são escassas, sendo uma área a se trabalhar, uma vez que, dados sobre sua composição e as modificações promovidas pelo processo fermentativo permitem maior esclarecimento sobre seus benefícios à saúde humana. Os estudos das condições de fermentação, por sua vez, permitem a otimização da produção, necessária para a aplicação em escala industrial e comercialização do natto.

Considerando o potencial de aplicação do natto em pó, este trabalho teve como objetivo investigar o efeito dos parâmetros quantidade de inóculo, temperatura e tempo de fermentação de grãos de soja da cultivar BRS 216 com *B. subtilis* Natto utilizando DCC (2<sup>3</sup>) durante a produção do natto, visando obter um produto com elevando teor de isoflavonas agliconas e atividade antioxidante.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 ASPECTOS GERAIS DA SOJA

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das *commodities* agrícolas mais importante e valiosa no grupo das leguminosas, por sua composição diferenciada.

O crescente interesse na soja é devido a seu papel como principal fonte na produção de óleos e proteínas vegetais para alimentação humana e animal, além de apresentar um grande potencial produtivo que a coloca em posição de destaque na economia (CARVALHO et al., 2010).

Acredita-se que a origem do cultivo da soja está na China, onde foram encontrados os primeiros vestígios de sua existência. Os primeiros registros escritos foram observados em inscrições em ossos e cascos de tartaruga, pertencentes às dinastias Yin e Shang de 3700 anos atrás. Também foram encontrados grãos de soja carbonizados de 2600 anos, durante uma escavação em Yongji County, Província de Jilin (QIU; CHANG, 2010).

A China foi o maior produtor e exportador mundial de soja durante a primeira metade do século 20. Os Estados Unidos, cujo uso inicial da soja foi como cultura forrageira (PROBST; JUDD, 1973), teve um rápido desenvolvimento na sua produção a partir de 1950 tornando-se o maior produtor mundial. No Brasil, a soja foi introduzida em 1908 por imigrantes japoneses nos Estados da Região Sul; Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul. Porém, foi somente a partir de 1970 que esta cultura se expandiu tornando o país o segundo maior produtor mundial (SANTOS; BACHA, 2003). Segundo Barbosa e Assumpção (2001), a soja foi uma das culturas que apresentou maior crescimento de cultivo no Brasil na segunda metade do século XX, o que justifica sua importância econômica para o país.

A produção de soja no Brasil, na safra 2011/2012, foi de 67,7 milhões de toneladas, colhida em uma área de 24,9 milhões de hectares, conforme o previsto pelo USDA (Departamento de Agricultura dos Estados Unidos). Para a safra 2012/2013, foi anunciada uma redução na produção de soja nos EUA, resultado da forte estiagem que tem se agravado no país. A produção brasileira de soja em 2012/13 deverá totalizar 82,24 milhões de toneladas, com aumento de 21% em comparação com a safra anterior. A previsão faz parte de levantamento divulgado em março pelo Instituto de Pesquisas Agroeconômicas SAFRAS & Mercado. A estimativa de área plantada passou de 25,2 milhões de hectares em 2011/2012 para 27,7 milhões na atual temporada, com aumento de 10%, com rendimento médio de 2.973 quilos por hectare, superando os 2.694 quilos obtidos no ano passado (<http://www.noticiasagricolas.com.br>, acessado em 10/03/2013). Com esses valores o

Brasil ultrapassa os EUA e assume a liderança no ranking de produção mundial nesta safra de 2012/2013.

Para Kaimowitz e Smith (2001), as características vantajosas do plantio da soja como boa produtividade e adaptação, o desenvolvimento de tecnologias genéticas e de plantio, além de incentivos fiscais e bom preço no mercado têm contribuído para a rápida expansão. Além disso, o aumento na demanda mundial por soja tem resultado em um aumento no investimento em pesquisa científica e desenvolvimento de novos produtos (ROSA et al., 2009).

A relação entre o consumo de soja e a saúde humana tem sido estudada pelas características nutricionais desse alimento, isto é, pelo elevado teor de proteínas, teor significativo de minerais e fibras, quantidade reduzida de gordura saturada e a ausência de colesterol, além da presença de compostos polifenólicos, como as isoflavonas (SILVA et al., 2006).

A composição química da soja pode variar com as condições climáticas, tipos de solo e de cultivares e práticas agrônômicas (HORAN, 1974). Segundo Ávila e colaboradores (2007), fatores genéticos podem influenciar no teor de óleo e proteínas dos grãos de soja, porém, estes também são fortemente influenciados pelo ambiente.

As frações de proteínas e óleo da soja compreendem aproximadamente 60% do total do peso seco do grão. Os grãos maduros contêm cerca de 40% de proteína, 22% de lipídeos, 30% de carboidratos, sendo aproximadamente 10% de açúcares livres e 6% de fibra; e 5% de cinzas em base seca (COSTA et al., 1974; YAMAMOTO, 2006).

Devido ao teor e qualidade das proteínas, o consumo de soja é de grande interesse para a alimentação humana, além de ser considerada nutricionalmente completa devido à presença de praticamente todos os aminoácidos essenciais (CALLOU, 2009; RYU et al., 2010). As proteínas presentes em maior quantidade são de reserva glicínica e  $\beta$ -conglícinina, as lipoxigenases, os inibidores de tripsina Kunitz, inibidores de protease de baixa massa molecular, a lectina e a urease (CALLOU, 2009).

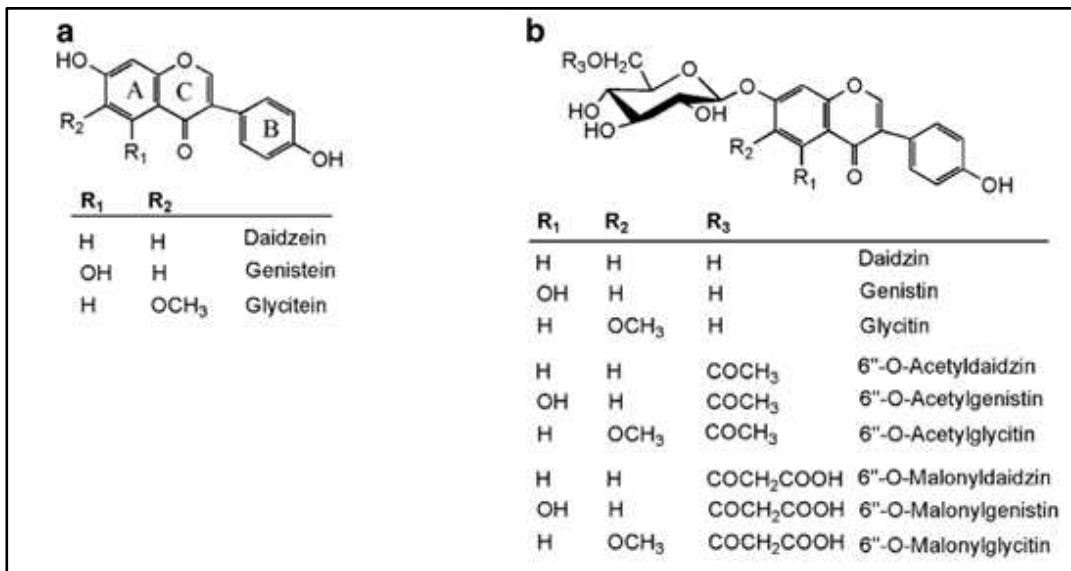
O teor de cinzas encontrado na soja é um índice da sua concentração mineral. O teor médio de potássio é de 2,3%, geralmente recomendado para o tratamento da hipertensão, sendo superior ao de outros minerais como cálcio (0,2%), magnésio (0,3%) e fósforo (0,6%) (VIEIRA et al., 1999; PAPAEO, 2004).

A soja contém vitaminas, tanto hidro como lipossolúveis, incluindo a vitamina recém-descoberta quinona pyrroloquinoline. Acredita-se que esta vitamina compõe o complexo da vitamina B e desempenha um papel importante no metabolismo de lisina, e pode ser consumida em alguns alimentos de soja como tofu e natto (KUMAR et al., 2010).

Além destes compostos, a soja contém as isoflavonas, que são compostos originários do metabolismo secundário, com estrutura química fenólica e que estão distribuídas no reino vegetal. As concentrações destes compostos são superiores nas leguminosas e, em particular, na soja sendo encontradas em concentrações de 0,1 a 5 mg/g (ESTEVE; MONTEIRO, 2001; SUGANO, 2006; COWARD et al., 1993). O teor de isoflavonas em grãos de soja é influenciado por fatores genéticos, ano de cultura e local de crescimento (PARK et al., 2001).

As isoflavonas da soja são encontradas nas formas agliconas (daidzeína, genisteína, gliciteína), glicosiladas (daidzina, genistina, glicitina), malonilglicosilada (6''-O-malonildaizina, 6''-O-malonilgenistina, 6''-O-malonilglicitina) e acetilglicosilada (6''-O-acetildaizina, 6''-O-acetilgenistina, 6''-O-acetilglicitina) (Figura 1).

**Fig. 1:** Estrutura química das isoflavonas agliconas (a) e glicosiladas (b)



Fonte: VILLARES et al.; 2011

As formas agliconas são biologicamente ativas, relacionadas aos efeitos benéficos para o organismo humano, uma vez que são absorvidas mais rapidamente pelo trato intestinal em relação as formas glicosiladas que apresentam maior massa molecular e são altamente hidrofílicas (BROWN, 1998; apud PYO et al., 2005). Porém, a forma predominante de isoflavonas nos grãos de soja *in natura* e em derivados não fermentados de soja, são as  $\beta$ -glicosídicas conjugadas (98 %) comparada às formas agliconas (2 %), em base seca (KUDOU et al., 1991; TSANGALIS et al., 2002;). Ribeiro e colaboradores (2007) observaram em 18 cultivares de soja que a forma predominante de isoflavona foi a malonilglicosídica (67 %). As formas  $\beta$ -glicosídicas e agliconas corresponderam a 31 % e 2 %. Estes valores podem variar dependendo da localização da cultura

sendo possível produzir soja com elevada concentração de isoflavona aglicona (CARRÃO-PANIZZI; BORDINGNON, 2000; AGUIAR, 2002).

Estudos relataram que o processamento térmico, a hidrólise enzimática e a fermentação dos grãos também podem afetar significativamente a distribuição isomérica das isoflavonas (PARK et al., 2001; TSANGALIS et al., 2002; PYO et al., 2005; CHOI et al., 2007; VILLARES et al., 2011). Choi e colaboradores (2007) isolaram *Bacillus* sp. do *doenjang*, pasta fermentada de soja muito apreciada na Coreia, e observaram o teor máximo de isoflavonas agliconas de 1,33 g/kg em trinta dias de fermentação.

Park e colaboradores (2001) pesquisaram a influência da fermentação em estado sólido com *Aspergillus oryzae* e aquecimento na produção da enzima  $\beta$ -glicosidase para o aumento do teor de isoflavonas agliconas em extrato de soja. Tanto a atividade enzimática quanto o tratamento térmico apresentaram influência positiva na bioconversão de isoflavonas.

Pyo e colaboradores (2005) por sua vez investigaram a possível aplicação de culturas funcionais de bactérias ácido lácticas, produtoras de  $\beta$ -glicosidase, em extrato de soja. A enzima das cepas *Lactobacillus* sp., *Bifidobacterium* sp hidrolisou completamente as isoflavonas daidzina e genistina em daidzeína e genisteína durante a fermentação por 48 h a 37° C, indicando o potencial para o desenvolvimento de uma bebida com alta estrogenicidade e melhor absorção, facilitando a biodisponibilidade das isoflavonas.

As formas ativas genisteína e daidzeína são utilizadas na medicina para a prevenção do câncer de próstata e do câncer de mama (LIGGINS et al., 2000; NAGATA et al., 2007; KANG et al., 2010; DONG; QIN, 2011). *In vitro*, a genisteína inibe diferentes tipos de células cancerosas e também enzimas críticas envolvidas na transdução de sinal (MESSINA et al., 1994). Além disso, as isoflavonas genisteína e daidzeína apresentam maior capacidade antioxidante frente às demais formas sendo consideradas um fator na longevidade das pessoas que consomem regularmente produtos à base de soja (ONOZAWA et al., 1998; BARBOSA et al., 2006).

Estudos epidemiológicos apontam uma menor incidência de osteoporose em mulheres pós-menopausa orientais, atribuída ao consumo regular de isoflavonas (CHEN et al., 2003; IKEDA et al., 2006).

Além de sua rica composição, a soja é considerada um alimento funcional. Os alimentos funcionais são definidos como aqueles que contêm uma ou mais substâncias capazes de atuar no metabolismo ou na fisiologia do ser humano, promovendo benefícios à saúde (PENHA et al., 2007).

Em 1999 o órgão de controle de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos da América, USA Food and Drug Administration (FDA), aprovou a descrição no rótulo de produtos de soja que o consumo de 25 g de proteína de soja ao dia, como parte de uma dieta pobre de gorduras

saturadas, pode reduzir o risco de doenças cardiovasculares. Tanto a Associação Americana do Coração quanto a ANVISA recomendam o consumo diário de no mínimo 25 g de proteína de soja para ajudar a reduzir o colesterol LDL. Seu consumo deve estar associado a uma dieta equilibrada e hábitos de vida saudáveis (IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas Resolução RDC nº. 278/2005. Atualizado em julho/2008. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)).

O reconhecimento formal da alta qualidade da proteína de soja veio na forma de uma decisão do Departamento de Agricultura dos EUA permitindo que a proteína de soja substitua 100 % da proteína animal no National School Lunch Program. Para se qualificar para a substituição completa, uma proteína deve ter uma correlação entre digestibilidade e teor de aminoácidos (PDCAAS) de pelo menos 80 % com referência ao leite, padrão determinado por pesquisas. Antes, a substituição era limitada a 30 % (MESSINA et al., 2002).

Atualmente, vários tipos de alimentos a base de soja estão disponíveis no mercado em todo o mundo. Alguns são produzidos com uso de técnicas modernas de processamento em grande escala, enquanto outros, de forma mais tradicional, baseado em técnicas orientais, geralmente conhecidos como alimentos tradicionais de soja (GOLBITZ, 1995; ALI, 2010). Entre esses alimentos destacam-se os não fermentados: soja verde fresca, grãos de soja, farinha integral e desengordurada, extrato de soja e derivados, tofu e okara; e os fermentados *tempeh*, misô, molhos de soja, natto, tofu e extrato de soja fermentados.

## 2.2 PRINCÍPIOS DA FERMENTAÇÃO

A fermentação é um processo anaeróbio de transformação de substâncias pela ação de microrganismos, tais como bactérias e fungos. Trata-se de um conjunto de reações químicas controladas enzimaticamente, em que uma molécula orgânica complexa é degradada em compostos mais simples com diferentes aplicações, liberando energia (REGER et al., 1993).

O homem tem consumido alimentos fermentados há mais de 10 mil anos, sendo a fermentação a forma mais antiga da biotecnologia alimentar, tradicionalmente valorizada como um sistema de preservação dos alimentos. As bactérias ácido-lácticas, por exemplo, apresentam algumas propriedades anti-microbianas úteis na fermentação de alimentos, fazendo com que estes sejam seguros para ingestão. O consumo de alguns microrganismos em alimentos fermentados, sem

quaisquer efeitos adversos para a saúde, é classificado como GRAS (Generally Recognized as Safe) (TAMANG, 2011).

No processo de fermentação pode-se obter alimentos com sabor, aroma e textura diferenciados (STEINKRAUS, 2002; RAGHUVANSHI; SINGH, 2009; HU et al., 2010). Este também é um meio para enriquecimento com aminoácidos e ácidos graxos essenciais, vitaminas, açúcares, antioxidantes e fitoesteróis, além de aumentar a disponibilidade e a assimilação de nutrientes no organismo.

Segundo Steinkraus (2002), o enriquecimento biológico de alimentos por fermentação pode impedir doenças nutricionais por aumentar o teor de proteínas ou melhorar o equilíbrio de aminoácidos essenciais, bem como aumentar o conteúdo ou disponibilidade de vitaminas, sendo este fato observado principalmente em países subdesenvolvidos.

Desde os tempos antigos, nas culturas mais tradicionais do mundo, os alimentos fermentados tem sido uma fonte de nutrição valorizada. Natto, missô, shoyu no Japão; tofu fermentado e molho de soja na China; *tempeh* na Indonésia; iogurte e Chutney na Índia; iogurte no Oriente Médio; Kefir na Rússia; creme de leite, creme de Piima e creme Fraiche na Europa; legumes em conserva, cerveja, pão e vinho em quase todo o mundo são os exemplos mais famosos dentre os alimentos fermentados.

Atualmente, frente a uma demanda por ingredientes funcionais, as indústrias de alimentos se encontram em um mercado de consumo específico e competitivo, como consequência buscam novos produtos na área (CAMARGO, 2000), como é o caso de produtos fermentados.

### **2.3 ALIMENTOS FERMENTADOS DE SOJA**

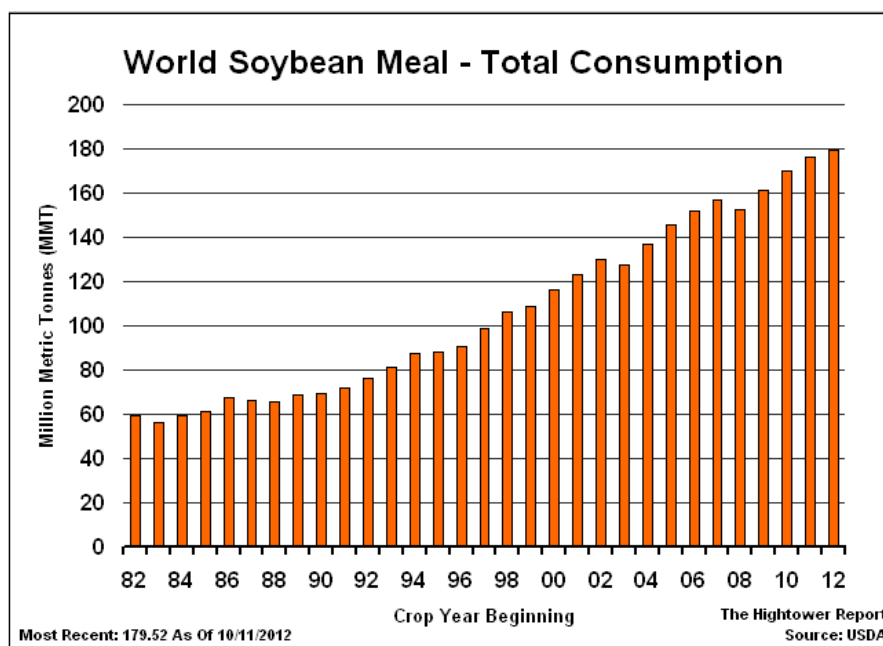
Os produtos a base de soja têm um importante papel nutricional como fonte de proteínas na dieta da população de países orientais. A alimentação é considerada o principal fator da longevidade encontrada no Japão (MUROOKA; YAMSHITA 2008; DEMETRIO, 2009). Segundo o Ministério da Saúde japonês os habitantes vivem, em média, 81,1 anos (77,6 para homens e 84,6 para as mulheres) e 73,6 anos conforme a Organização Mundial de Saúde (DEMETRIO, 2009).

Na década de 1990, a ingestão de proteína de soja no Sudeste Asiático variou de 10 a 50 gramas por dia, enquanto nos EUA o consumo foi de 1 a 3 g por dia (BARNES et al., 1995), uma vez que nos países ocidentais o consumo de soja e seus derivados têm uma história mais recente e de menor intensidade. Porém, tais produtos tornaram-se mais populares ao longo dos últimos anos

(Figura 2). Em 2000, 27% dos consumidores dos Estados Unidos relataram o consumo de produtos de soja pelo menos uma vez por semana, o que é quase o dobro do apresentado em 1998 (MESSINA; LOPRINZI, 2001).

Keinan-Boker e colaboradores (2002) relataram em seu estudo uma pequena, porém diversificada, ingestão de produtos de soja em todos os países da Europa Ocidental. Nos países do mediterrâneo (Espanha, França, Itália e Grécia) são consumidos com frequência os produtos a base do grão e substitutos lácteos; grãos e brotos na Europa central (Holanda e Alemanha); substitutos da carne na Dinamarca; e substitutos lácteos na França e no Reino Unido.

**Fig. 2:** Crescimento mundial do consumo de soja na alimentação humana de 1982 a 2012



Fonte: USDA - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos

No Brasil, apesar de ser grande produtor mundial, essa leguminosa é pouca consumida *in natura* e em alimentos derivados. Os dados de consumo são escassos e pontuais, provenientes de pesquisas em Universidades e relacionam a falta de conhecimento em relação aos benefícios nutricionais da soja, aos produtos disponíveis e às formas de introduzi-la na alimentação como uma das causas do baixo consumo.

Behrens e Da Silva (2004) avaliaram as crenças e os hábitos de consumo de indivíduos de Campinas-SP em relação à soja e derivados da soja e concluíram que, embora o consumo frequente seja baixo, a atitude dos entrevistados em relação à soja foi positiva. Para uma maior implementação de produtos no mercado, foi recomendado reforçar a informação sobre os benefícios à saúde junto à população.

Bedani e colaboradores (2007) conduziram um estudo semelhante na cidade de Araraquara-SP, com o objetivo de avaliar a frequência e os motivos de consumo relacionados a dados socioeconômicos. Dos 271 entrevistados, a maioria (46,9%) pertenciam à faixa etária entre 25 a 45, e 39,5% com ensino médio completo. Verificou-se também que 30,3% dos entrevistados possuíam uma renda de mais de 5 salários mínimos, 36,2% de 3 a 5 salários mínimos e 32,8% recebiam de 1 a 3 salários mínimos. Os resultados apontaram que o consumo de soja e de seus derivados foi significativo de 46% entre os participantes do estudo, com uma maior ingestão desses alimentos conforme o aumento do grau de escolaridade e renda familiar, possivelmente devido à maior acesso a informações sobre a soja.

Em Cascavel-PR, foi realizada uma pesquisa com alunos da 7ª série (faixa etária de 12 a 14 anos) e 8ª série (faixa etária de 13 a 16 anos) do Ensino Fundamental e seus responsáveis, sobre o conhecimento e frequência de consumo da soja e derivados. As informações obtidas em um questionário inicial indicou que na 7ª série, a maioria consumia o extrato e o óleo de soja. Os dados obtidos na 8ª série indicaram a carne de soja e o suco contendo extrato como os alimentos mais consumidos. Em um questionário sobre “mitos e verdades” sobre o consumo de soja e seus benefícios, observou-se uma relação direta na falta de conhecimento dos alunos e de seus responsáveis (HIRAOKA; BONFLEUS, 2008).

O sabor característico da soja também limita a sua aceitabilidade nos países ocidentais. Um dos principais componentes responsáveis pelo sabor característico, juntamente com a auto-oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados, é a enzima lipoxigenase que forma os compostos voláteis responsáveis pelos sabores denominados de rançosos (SILVA et al., 2007). Tal enzima é sensível ao calor e facilmente inativada por aquecimento. Produtos derivados de soja produzidos industrialmente são submetidos a tratamentos térmicos e, portanto, não apresentam este tipo de problema (HIRAOKA, 2008). O processo fermentativo também pode causar está alteração positiva. Hara e colaboradores (1982) relataram que a fermentação reduz os sabores desagradáveis e a sensação de adstringência, fator atribuído à ação dos microrganismos envolvidos no processo fermentativo.

Outra modificação a ser destacada na fermentação é a simples quebra, por hidrólise enzimática, das macromoléculas de proteínas, lipídeos e carboidratos constituintes do grão em pequenas moléculas, tais como peptídeos, aminoácidos, ácidos graxos e açúcares, que são responsáveis pelas propriedades sensoriais únicas e funcionais dos produtos finais (KWON et al., 2010).

O processo fermentativo, assim como tratamentos térmicos, auxilia na bioconversão das isoflavonas, com aumento da forma ativa aglicona no produto final, sendo que os produtos não-

fermentados de soja contêm menor teor de isoflavonas agliconas do que os fermentados (AGUIAR; PARK, 2004).

Um fator que restringe o consumo de soja é a indução a flatulência causada pela pouca digestibilidade de alguns carboidratos da soja, como rafinose e estaquiase, resultando na produção de gases no trato gastrointestinal humano (CAMARGO et al., 2000; HU et al., 2010). Os microrganismos responsáveis pela fermentação produzem enzimas que promovem a hidrólise e diminuem o teor dos oligossacarídeos presentes, reduzindo as causas de flatulência e gerando produtos de maior aceitabilidade.

A fermentação também se mostra eficiente para a remoção de inibidores de proteases que são proteínas não glicosiladas conhecidas popularmente como inibidores de tripsina (CALLOU, 2009). Esses inibidores são frequentemente encontrados nas cascas dos grãos de soja e impedem a ação de enzimas digestivas, como a tripsina, dificultam a digestão das proteínas e interferem negativamente na absorção de nutrientes pelo organismo (MISSÃO, 2006).

Entre os principais efeitos benéficos na saúde humana relacionados ao consumo regular de produtos a base de soja, destaca-se a prevenção de doenças como câncer de mama (MESSINA; LOPRINZI, 2001; BURSSSENS et al., 2011); câncer de próstata (NAGATA et al.; 2007; BURSSSENS et al., 2011); osteoporose (IKEDA et al., 2006; SUMI et al., 2009); trombose (SUZUKI et al., 2003); doenças cardiovasculares (MESSINA; LOPRINZI, 2001); além de apresentar atividade antioxidante (ROSA et al., 2009) e diminuir a fração LDL - colesterol (ARAI et al., 2000). Pesquisas também relacionaram as isoflavonas presentes em alimentos fermentados de soja com a redução do risco da diabetes tipo 2 (KWON et al., 2010).

Frente a uma crescente conscientização da população sobre uma melhor alimentação com a inclusão de soja na dieta e a importância das transformações decorrentes da fermentação, observa-se um grande crescimento na produção e variedade de alimentos fermentados à base de soja. Entre esses produtos destaca-se o shoyu, o misô, *tempeh*, *thua nao*, natto, além de condimentos africanos como *Soy-daddawa*, *Kinema* e *Meju*.

O shoyu, também conhecido como molho de soja, ou em chinês, *chian-yu*, é o alimento a base de soja mais conhecido e amplamente consumido nos países ocidentais. É um líquido marrom escuro, obtido da fermentação de soja com trigo, ou outro cereal amiláceo, de sabor salgado, com aroma agradável, usado como flavorizante ou componente nutritivo em muitos pratos orientais. Segundo Murooka e Yamshita (2008) a produção tradicional de shoyu é realizada em tanques de madeira em fermentação estática com duração de 1 a 2 anos. No entanto, atualmente, a maior parte é produzida em sistemas computadorizados e automatizados. A soja umedecida é cozida em alta pressão e temperatura, enquanto o trigo é torrado e moído. Em seguida, a mesma quantidade, em

peso, da soja e do trigo, é misturada com uma pequena quantidade do inóculo microbiano denominado *koji*, contendo *Aspergillus oryzae* ou *A. sojae*. A fermentação dura de 8 a 12 meses, com agitação constante. Um processamento mais rápido é obtido mantendo-se a temperatura em 15°C no primeiro mês, seguido por 28°C por quatro meses, terminando com 15°C por mais um mês (ROSA et al., 2009).

O misô, por sua vez, é um produto fermentado produzido a partir de uma mistura de soja, arroz e sal marinho com adição de *koji*, uma espécie de pasta de arroz cozido, sobre a qual é inoculado *A. oryzae*, para que ocorra a fermentação. A mistura passa então por uma segunda fermentação, que degrada os carboidratos e proteínas, até adquirir a consistência desejada, o que pode levar de um a 20 meses (MUROOKA; YAMSHITA, 2008). O resultado é uma pasta levemente salgada usada em sopas, patês, tempero de saladas e refogados e até como molho para massas.

O *tempeh* é um alimento de soja fermentado tradicional na Indonésia, sendo muito consumido também nas Filipinas e na Malásia (HACHMEISTER; FUNG, 1993; MORAIS et al., 1996), obtido pela fermentação da soja, descascada e cozida, com *Rhizopus* sp por 1 a 2 dias. Este tem despertado interesse dentre os alimentos fermentados de soja, devido ao seu valor nutritivo e funções regulatórias do metabolismo (ASTUTI et al., 2000, NAKAJIMA et al., 2005). Devido à ação do microrganismo durante a fermentação, há a produção de teor significativo de vitamina B<sub>12</sub>, geralmente não encontrado em alimentos de origem vegetal (NAKAJIMA et al., 2005).

O *Soy-daddawa*, o *Kinema* e o *Meju* são condimentos a base de soja, geralmente preparados de forma tradicional em domicílios africanos para consumo próprio e, conseqüentemente, com alta variabilidade de condições. A fermentação é usualmente processada em estado sólido com alta umidade e muitas vezes sem inoculação específica de microrganismos (OMAFUVBE et al., 2000). O produto resultante apresenta um sabor característico devido à amônia e apresenta fios viscosos entre os grãos. São muito utilizados em pratos tradicionais, para enriquecer o sabor e como substitutos de baixo custo da carne (SARKAR et al., 1994).

*Thua nao* é um alimento muito apreciado como substituto da carne ou como condimento para saborizar pratos tradicionais na Tailândia. É preparado pela fermentação natural da soja limpa, hidratada e cozida, durante 2 a 3 dias em folhas de bananeiras e depois assadas antes do consumo (CHUKEATIROTE et al., 2006). É um produto considerado similar ao natto por ser fermentado principalmente por *B. subtilis* (INATSU et al., 2006).

O natto é um preparado de soja obtido por fermentação dos grãos com *Bacillus subtilis* Natto. Apresenta sabor adstringente e um odor característico assim como uma textura viscosa que recobre os grãos. Sua origem é datada de 1000 anos, não é definida geograficamente, porém é um

prato muito apreciado no Japão. Produtos semelhantes são conhecidos na China, Índia e Filipinas, o que indica suas possíveis origens.

## 2.4 NATTO

Natto é um alimento tradicional composto por grãos de soja íntegros fermentados e muito apreciado no norte do Japão, especialmente no café da manhã. Pode ser usado como condimento para enriquecer pratos com carnes, frutos do mar e vegetais (WEI et al., 2001) fazendo parte de pratos orientais tradicionais como *sushi*, *temaki*, ou sopa de misô; consumidos com arroz cozido e cebolinha; ou até mesmo com açúcar e em forma de sorvete.

O termo natto surgiu pela primeira vez em 1068 em um documento japonês e pode ser separado em dois caracteres: o primeiro significa "oferecer" e o segundo significa "grão" ou "feijão", possivelmente refletindo o fato de que, nos primeiros tempos, o natto tinha como objetivo ser usado como oferenda em altares.

A localização e a data de sua origem são incertas, porém, existem várias teorias sustentando que o natto surgiu no Japão durante o período do século 1 ao século 11, de maneira acidental, colocando-se a soja cozida em contato com a palha de arroz. Conta uma lenda que soldados que estavam em uma batalha no nordeste do Japão entre 1086 e 1088 foram atacados enquanto alimentavam seus cavalos com soja. Apressadamente embalaram as leguminosas em palha e só as abriram alguns dias mais tarde, quando já haviam sido fermentadas. Os soldados provaram e apreciaram o sabor (SHURTLEFF; AOYAGI, 2007).

Inicialmente, o natto era conhecido e apreciado principalmente no norte de Kanto, Japão, com produção variável em pequenas fazendas para venda por comerciantes independentes. A maioria das áreas em que o natto era popular apresentava certas características como ser distantes do mar e muitas vezes em áreas montanhosas. Com isso, as pessoas tinham acesso a pouca proteína de peixe e outros frutos do mar em sua dieta; além dos invernos longos e frios, com neve profunda necessitando de auto-suficiência alimentar (MITSUBOSHI, 2006).

A medicina rudimentar associava o natto a diversos benefícios à saúde, entre eles o antibacteriano. A intoxicação alimentar era comum no Japão na época, o que levava as pessoas a ingerirem o natto para prevenir a cólera, febre tifóide e disenteria (MUROOKA; YAMSHITA, 2008).

No início do período Meiji (1868 a 1912), o Japão passou por mudanças econômicas, políticas e sociais, com uma rápida industrialização e a abertura dos portos depois de mais de 250 anos de isolamento. Com a crescente conscientização de saneamento, a maneira como o natto era vendido, em cestas de bambu ou bandejas nas ruas, caiu em popularidade. O produto foi modernizado e sua distribuição expandida no início de 1900, com a construção de ferrovias. Na década de 1980, com a propagação dos grandes supermercados, o consumo de natto aumentou drasticamente sendo um produto acessível a diversos consumidores (KIUCHI, 2001).

### 2.4.1 Tipos de Natto

Há três tipos de natto: o “itohiki-natto”, o “hama-natto” e o “yukiwari-natto” (KIUCHI et al., 1976; SUNAO, 2001).

Itohiki-natto é muito popular e produzido em grande quantidade, principalmente nos arredores de Tóquio e no leste do Japão. Por isso a palavra “natto” geralmente significa itohiki-natto.

Hama-natto difere do itohiki-natto tanto na aparência quanto no método de fabricação. É um alimento obtido por fermentação fúngica, ao invés de bacteriana, com adição de *koji*, um preparado de trigo e cevada inoculado com espécies de *Aspergillus*, durante a fabricação. Tem gosto semelhante ao misô de soja e por isso se enquadra na categoria de “Shih” e shoyo, juntamente com o missô. Além das enzimas originárias do *A. oryzae* do *koji*, há enzimas produzidas por bactérias como *Micrococcus*, *Streptococcus* e *Pediococcus* que se distribuem em grande quantidade sobre a superfície e no interior do hama-natto e que também contribuem na hidrólise dos componentes da soja.

Um terceiro tipo de soja fermentada produzida no Japão é conhecida por yukiwari-natto. Esse produto é feito com a mistura de itohiki-natto com sal e *koji* de arroz sob agitação à temperatura de 25 a 30° C por aproximadamente 2 semanas. Como ocorre com o molho de soja e missô, o fungo escolhido para preparar o *koji* é o *A. oryzae*.

### 2.4.2 Produção do Natto

O processo de produção do natto é relativamente simples e geralmente inclui etapas como lavagem dos grãos, cozimento, inoculação e incubação (STEINKRAUS, 1983; OHTA 1986; MARUO; YOSHKAWA 1989).

Inicialmente, o natto era feito nos próprios domicílios para consumo das famílias, simplesmente envolvendo a soja cozida em trouxinhas feitas com palha de arroz e colocando-as em um local quente e úmido durante a noite até que se tornassem pegajosas. Isso resultava na fermentação pela bactéria encontrada naturalmente na palha de arroz, que hoje sabe-se tratar da *B. subtilis* Natto (TAKAHASHI et al., 2005).

Uma mudança significativa ocorreu no período Taisho (1912-1926), quando pesquisadores descobriram uma forma de produzir a cultura do *Bacillus subtilis* Natto sem a necessidade da palha. Esta evolução no processo de produção permitiu resultados mais homogêneos no produto (SHURTLEFF; AOYAGI, 2007).

Durante os anos de 1970 foram obtidos grandes avanços na produção do natto. Os grãos pequenos de soja, especialmente os da China, eram preferidos e houve mudanças nos equipamentos utilizados, como o desenvolvimento de incubadoras para a fermentação.

No Brasil, os esforços na busca do grão ideal foram realizados pela Empresa Brasileira de Agropecuária - Centro Nacional de Pesquisa de Soja (EMBRAPA– Soja) que desenvolveu várias linhagens que deram origem a algumas cultivares de soja para utilização exclusiva na produção de soja alimento. Entre elas a BRS 216, que apresenta hilo amarelado, é ideal para a produção de brotos de soja e para a produção do natto, devido ao tamanho pequeno dos grãos (SILVA et al., 2009).

O Dr. K. Yabe, microbiologista japonês, publicou o primeiro relatório científico sobre a fermentação do natto em 1894. Como não se tinha conhecimento do que ocorria na soja envolta em palha para transformar-se em natto, haviam superstições complexas sobre a melhor maneira de se obter um natto de qualidade. Sua pesquisa relatou quatro tipos de bactérias isoladas, discutiu suas necessidades nutricionais e descreveu o processo de desenvolvimento de natto comercial (SUGANO, 2006).

Segundo dados estatísticos, a produção de natto apresentou um aumento anual e em 1992 a produção foi 3,3 vezes superior que de 1965, provavelmente devido ao acentuado progresso do controle de qualidade do natto (NARUSE, 2006).

Os estudos de Taira (1990) propuseram que a qualidade do natto está primeiramente associada às características dos cultivares dos grãos de soja. Uma elevada absorção de água nos grãos é necessária para se obter um grão cozido macio, e quantidades proporcionais de açúcares

livres, sacarose, rafinose e estaquiose são importantes para se alcançar condições adequadas para a fermentação.

Geater e colaboradores (2000) estudaram a influência de diferentes cultivares, de diferentes safras e locais de cultivo na qualidade do natto. A absorção de água nos grãos, a perda de água após cozimento em vapor, a dureza após cozimento e durante a fermentação influenciaram significativamente a qualidade do natto na análise sensorial em relação ao sabor e a textura. A cor dos grãos no cozimento e durante a fermentação não afetou a qualidade do produto.

Wei e Chang (2004) observaram a concentração de açúcares no grão de soja como outro fator importante para a qualidade do natto. Os açúcares solúveis são utilizados como fonte de carbono inicial e fonte de energia para a cepa *B. subtilis* Natto, portanto, seu alto teor promove o crescimento microbiano e torna o produto final mais doce. Entretanto, um elevado teor de sacarose não é desejável, pois elevará rapidamente a temperatura na etapa inicial da fermentação acima do desejável para o crescimento das bactérias. Porém, elevado teor de estaquiose é desejável, pois sua hidrólise em açúcares simples faz com que a fermentação prossiga gradualmente.

As condições de cada etapa da produção do natto também influenciam sua qualidade final. O natto apresenta diferente aroma, textura, sabor e viscosidade em várias combinações de processamento. Matsumoto e colaboradores (1993) estudaram o efeito da temperatura e do tamanho do inóculo na aparência do natto. Os resultados indicaram que a fermentação ocorreu em boas condições a 35° C, com a inóculo de 10<sup>4</sup> a 10<sup>6</sup> células/g, ou a 40° C, com 10<sup>2</sup> a 10<sup>4</sup> células/g de inóculo. Do ponto de vista de aparência, cor e dureza, 18 a 20 horas de fermentação foram suficientes.

Além desses fatores, Wei e colaboradores (2001) também analisaram a influência do tempo de cozimento e observaram que 40 min de cozimento, um inóculo de 10<sup>6</sup> a 10<sup>7</sup> UFC.g<sup>-1</sup> (em base úmida) e 18 h de fermentação foram condições adequadas para a obtenção de um natto de qualidade, isto é, com alta viscosidade, maciez e aroma moderado. Também foi observado que os grãos em tempos mais prolongados no vapor, possivelmente apresentaram alteração de sua microestrutura tornando-a mais penetrável às bactérias, afetando assim positivamente a textura do produto final, além de diminuir o tempo de fermentação necessário para obtenção de um produto de boa qualidade.

Cerca de três quartos da população japonesa consomem natto pelo menos uma vez por semana e metade come natto uma vez a cada 3 dias, em média (MUROOKA; YAMSHITA, 2008).

A produção de natto no Japão ultrapassou 300.000 toneladas por ano em 2009 (SUMI et al., 2009), sendo um aumento de produção comparado ao valor de 236.000 toneladas previsto pelo Ministério da Agricultura, Florestas e Pesca do Japão, em 2005 (KIMURA et al., 2011).

Em relação a comercialização do natto, embora seu tempo de prateleira seja estimada em uma semana, a maior parte do natto produzido é vendido no Japão dentro de dois ou três dias de sua fabricação em copos de papel (A) ou bandejas de isopor (B) (Figura 3) (KIUCHI, 2001; KIMURA et al., 2011).

**Fig. 3:** Forma de comercialização do natto em Londrina-PR.



### 2.4.3 Características Bioquímicas do Natto

O natto é um alimento proteico e quando comparado a outras fontes de proteínas apresenta elevado valor nutritivo. Seu teor de proteínas é estimado de 16,7 a 22,7%, 11,4% de lipídeos, 5,2% de carboidratos e 2,3% de minerais, em base úmida (STANDAL, 1963, KIUCHI et al., 1976, REGITANO-D'ARCE, 1982, 2006).

Segundo Sunao (2001), o teor de lipídios varia de 2,8, 10,9 a 6,4% para itohiki, yukiwari e hama-natto. A porcentagem de ácidos graxos livres do itohiki-natto e hama-natto é de 12% do peso úmido, semelhante aos de soja crua, porém a do yukiwari-natto é de 5 a 18%. O teor de ácidos graxos livres é considerado elevado, sugerindo como consequência, a sensação de adstringente. Já o gosto doce é resultante da atividade enzimática microbiana nos açúcares originalmente presente nos grãos de soja (WEI; CHANG, 2004).

O teor de aminoácidos presente no natto em diferentes tempos de fermentação foi analisado por Weng e Chen (2010). Na soja cozida não-fermentada, o teor de leucina foi de 7,36 g/100 g de matéria seca. Após 36 h de fermentação, o teor de aminoácidos essenciais diminuiu,

porém quando foi fermentada por 48 h houve um aumento significativo de valina (93,6%) e glicina (50%), com exceção da histidina. Assim, concluiu-se que os valores nutricionais da soja cozida podem ser aumentados após 48 h de fermentação.

Durante a fermentação do grão de soja para a produção do natto, várias enzimas podem ser produzidas pela *B. subtilis* Natto, como proteases, nattokinase,  $\beta$ -glicosidasas entre outras.

Chukeatirote e colaboradores (2006) relataram uma baixa ou inexistente produção de lipase pela *B. subtilis* Natto na fermentação para produção do natto, bem como em outros produtos fermentados à base de soja. Segundo Omafuvbe (2000), na produção de *soy-daddawa*, produto semelhante ao natto, a atividade da lipase foi observada apenas após 24 h de fermentação, tempo tardio em comparação com as outras enzimas. Como o grão de soja é rico em óleo, concluiu-se que a bactéria não é uma boa produtora de lipase.

A nattokinase é uma enzima produzida pela *B. subtilis* Natto e contribui para a sua viscosidade, além de apresentar atividade fibrinolítica que ajuda a dissolver coágulos sanguíneos (FUJITA et al., 1993, 1995; SUMI et al., 2009; MUROOKA; YAMSHITA, 2008).

O natto ainda apresenta outras enzimas que auxiliam o organismo na assimilação dos nutrientes, como a protease capaz de hidrolisar as proteínas da soja em aminoácidos. As cepas utilizadas na produção do natto são boas produtoras de proteases (KADA et al., 2008) e liberam aminoácidos que são utilizados como substrato para a nutrição do microrganismo e responsáveis pelo aroma característico do produto.

Omafuvbe e colaboradores (2008) observaram que *soy-daddawa* apresentou teor elevado de compostos solúveis obtidos pela ação de enzimas nos componentes orgânicos dos grãos fermentados, especialmente aminoácidos livres. O aumento rápido de aminoácidos livres nos primeiros estágios da fermentação coincidiu com o aumento da atividade da protease. Também houve um aumento no pH, possivelmente devido à proteólise e liberação da amônia no meio. A liberação de amônia, em tempos prolongados de fermentação, foi relacionada com o aroma marcante do natto (KADA et al., 2008).

O natto apresenta um fluido viscoso que também é uma característica marcante deste produto. Durante a fermentação, a *B. subtilis* Natto produz polímeros de ácido glutâmico, o que confere ao produto final uma superfície com aparência e textura viscosa. A qualidade do natto está diretamente relacionada ao comprimento e a consistência desses filamentos (ROSA, 2009; HU et al., 2010). Entretanto, em tempos prolongados de fermentação, ocorre uma diminuição de ácido glutâmico devido à maior produção de amônia, afetando a síntese de seu polímero. Este fato foi atribuído ao sistema metabólico da *B. subtilis* que utiliza o ácido glutâmico como fonte de carbono e nitrogênio (KADA et al., 2008). Além desta propriedade, o ácido glutâmico é um composto que

pode auxiliar na absorção de cálcio no intestino, sendo que esse efeito pode ajudar no combate a osteoporose em mulheres pós-menopausa (TANIMOTO et al., 2007; MUROOKA; YAMSHITA, 2008).

O natto também é rico em vitaminas E, K<sub>2</sub> e do complexo B. A vitamina E tem propriedade antioxidante e ajuda na circulação do sangue. Devido a presença de vitamina K<sub>2</sub>, cujo teor é de 870 µg/100 g, o consumo regular do natto faz parte de um tratamento alternativo para prevenção de osteoporose (SUMI; YATAGAI, 2006; SUMI et al., 2009) e que estimula a formação óssea (MUROOKA; YAMSHITA, 2008). A empresa DuPont, Brasil, investe em pesquisas neste âmbito e por meio de sua linha alimentícia Solae<sup>®</sup> lançou biscoitos com vitamina K<sub>2</sub> isolada do natto, visando a crescente busca dos consumidores por alimentos funcionais.

As isoflavonas também são foco de pesquisas realizadas com o natto, para se estabelecer a relação entre seu teor e os resultados positivos obtidos em formas alternativas de prevenção e combate a determinadas enfermidades (TULEY, 1995). O teor de isoflavonas glicosiladas (daidzina, genistina, glicitina) em grãos de soja *in natura* é em média de 640 µg/g de soja, enquanto a forma aglicona (daizeína, genisteína, gliciteína) é encontrada em torno de 24 µg/g de soja (ROSSI et al., 2004), sendo essa concentração influenciada pela variabilidade genética e efeitos do ambiente (CARRÃO-PANIZZI et al., 2003). Entretanto, os efeitos benéficos da soja estão relacionados às isoflavonas agliconas.

Na produção do natto, em que a soja permanece de molho em água a temperatura ambiente por longo período, pode-se observar uma redução de 11% no teor de isoflavonas. Quando a soja é submetida ao cozimento esta redução é de 50%, possivelmente pelo aumento da solubilidade provocado pelo aumento da temperatura (WANG, 1995). O processo fermentativo também pode alterar o teor e as formas das isoflavonas no produto final, promovendo um aumento das formas agliconas genisteína e daidzeína como consequência da ação hidrolítica da β-glicosidase produzida pelas bactérias utilizadas no processo (FUKUTAKE, 1996; CARRÃO-PANIZZI et al., 2003; CHO et al., 2009).

Ibe e colaboradores (2001) relataram pela primeira vez a produção da enzima β-glicosidase pela *B. subtilis* Natto utilizado na produção do natto e relacionaram a sua atividade ao acúmulo de isoflavonas agliconas no produto final. Estes resultados foram observados em outros produtos a base de soja fermentados com espécies de *Bacillus* (CHOI et al., 2007; CHO et al., 2009, 2011; HU et al., 2010). Entretanto, Aguiar e colaboradores (2007) observaram que no natto, o teor de isoflavonas agliconas foi similar ao de glicosiladas, concluindo-se que a bactéria utilizada na fermentação não produziu enzima com atividade β-glicosidase. Nagata e colaboradores (2007)

observaram um teor inferior a 15% de isoflavonas agliconas em relação ao de isoflavonas totais que foi 1273 µg/g de natto.

Estudos epidemiológicos sugerem que a ingestão de antioxidantes provenientes de alimentos pode reduzir os danos oxidativos induzidos por radicais livres, exercendo assim um efeito benéfico à saúde humana. Pesquisas têm relatado a existência de atividade antioxidante na soja, sendo esta relacionada à presença da forma bioativa de isoflavonas. Além disso, descobriu-se que os produtos fermentados de soja, incluindo os produtos orientais tradicionais, tais como natto, missô, *tempeh*, apresentam uma atividade antioxidante mais elevada do que a soja *in natura* (INATSU et al., 2006; HUANG, 2011). Hu e colaboradores (2010) analisaram a capacidade antioxidante do natto de soja preta, que apresentou valor maior que o controle de soja cozida não inoculada. Além disso, a utilização de soja preta fermentada com *B. subtilis* Natto, possuindo atividade antioxidante, foi sugerida como uma nova estratégia para aumentar o valor da soja preta e desenvolver novos produtos como suplementos dietéticos e alimentos funcionais.

No processo fermentativo há diferentes fatores que influenciam na formação do produto final. Assim, a utilização de um delineamento composto central (DCC) auxilia na avaliação de efeitos de 2 ou mais fatores e suas interações nas variáveis respostas (BOX; WILSON, 1951).

A análise de superfície de resposta é um conjunto de técnicas matemáticas e estatísticas que têm sido utilizadas com sucesso para desenvolver, melhorar e otimizar processos (MYERS; MONTGOMERY, 2002). Esta técnica é utilizada com frequência na modelagem e otimização de processos bioquímicos e biotecnológicos relacionados a sistemas alimentares (CACACE; MAZZA, 2003), como em indústrias japonesas com o objetivo de obter produtos de alta qualidade (MYERS; MONTGOMERY, 1995; GALDÁMEZ, 2002).

O natto apresenta os benefícios nutricionais da soja associados ao processo fermentativo que aumenta o teor de compostos relacionados à prevenção de diversas doenças. Sua aparência vem retardando a expansão de seu consumo, principalmente nos países ocidentais.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Produzir natto em pó por fermentação de grãos de soja, cultivar BRS 216, com *Bacillus subtilis* Natto utilizando o DCC para avaliar o efeito da adição de inóculo em diferentes quantidades com diferentes tempos e temperaturas de fermentação e avaliar sua composição química e enzimática.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir o natto com grãos de soja, cultivar BRS 216, e *B. subtilis* Natto avaliando a influencia dos fatores inóculo (UFC/mL), tempo (h) e temperatura (°C) de fermentação utilizando delineamento composto central;
- Determinar as funções resposta: teor de isoflavonas agliconas, capacidade antioxidante e atividade de  $\beta$ -glicosidase das amostras de natto e definir as melhores condições de produção;
- Validar os melhores modelos matemáticos obtidos;
- Produzir natto em pó por liofilização nas melhores condições de fermentação;
- Determinar a composição centesimal, açúcares totais, teor de isoflavonas agliconas, atividade antioxidante e as enzimas com atividade  $\beta$ -glicosidase, proteases, lipases e celulasas no natto otimizado liofilizado.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 MATÉRIA-PRIMA

Os grãos de soja da cultivar BRS 216, desenvolvida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Soja) – Londrina/PR, foram utilizados para a produção do natto. Os grãos foram submetidos à uma seleção prévia para a remoção de danificados ou manchados e de materiais estranhos.

A cultivar BRS 216 apresenta grãos com hilo amarelado e tamanho pequeno, média de 5,83 mm x 5,48 mm x 4,94 mm, com peso de 11,54 g/100 grãos, sendo ideal para a produção do natto (Figura 4).

**Fig. 4:** Grãos de soja da cultivar BRS 216



#### 4.1.2 MICRORGANISMO

Foi utilizado o *Bacillus subtilis* Natto isolado no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, identificado pela Fundação André Tosello (CCT 7712) e cedido pela Profa. Dra. Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi.

### 4.1.3 REAGENTES

Os reagentes foram de grau de pureza analítica de diferentes procedências comerciais.

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 PRODUÇÃO DO NATTO

#### 4.2.1.1 Preparo do inóculo

A metodologia empregada para o preparo do inóculo de *Bacillus subtilis* Natto foi descrita por Hu e colaboradores (2010). A *B. subtilis* Natto foi preservado em meio de cultivo contendo (g/L): peptona, 50; extrato de carne, 30; e ágar, 60, incubado a 37° C por 48 h e estocado a 4° C. A cepa em ágar inclinado foi transferida e cultivada em 10 mL de caldo nutriente (NB) composto por peptona, 5 g/L e extrato de carne, 3 g/L. Após 48 h a 37° C, o cultivo foi centrifugado a 5000 xg por 10 min e o pellet de células ressuspenso em 5 mL de água estéril contendo 8,5 g/L de NaCl, pH 7 e, posteriormente, diluído até a população viável necessária, conforme experimentos.

A contagem da bactéria foi realizada por turbidimetria segundo Ernandes (2009) com algumas alterações. Foram realizadas diversas diluições (1:5 – 1:80) e procedido leitura a 400 nm em espectrofotômetro. Uma alíquota de 1 mL foi transferida de cada diluição para cadinhos previamente pesados e colocados em estufa a 105° C até peso constante. Foi contruida uma curva padrão relacionando a leitura de absorvância com o peso da biomassa. Também foi realizada contagem das unidades formadoras de colônias presentes nas diluições em microscópio, utilizando Câmara de Neubauer. Os valores de máximo e mínimo do inóculo escolhidos para o delineamento composto central (DCC) foram baseados em estudos preliminares e relacionados à leitura de absorvância em espectrofotômetro a 400 nm.

#### 4.2.1.2 Teste de dureza nos grãos cozidos

A dureza dos grãos de soja foi medida em um texturômetro (Stable Micro Systems, modelo TA.XT *plus* Texture Analyser, Surrey, UK), segundo descrito por Mori (2001), com algumas

modificações, na qual as amostras hidratadas e cozidas em autoclave, a 121° C, por 10, 20, 30 e 40 min foram comprimidas a 25% da altura inicial com uma força de 0,05N, utilizando um cilindro de compressão à velocidade de 2 mm/s com probe SMS PI25L. Uma amostra de natto comercial também foi testada para comparação.

#### **4.2.1.3 Preparo dos grãos de soja para a fermentação**

Os grãos de soja, após a remoção de impurezas foram lavados, embebidos em água à temperatura ambiente (28° C) por aproximadamente 14 h, até o dobro do peso inicial e, em seguida, drenados. Os grãos hidratados foram cozidos no vapor a 121° C (1 kg/cm<sup>2</sup>) por 20 min em autoclave. Os grãos cozidos foram imediatamente cobertos com uma folha de alumínio, resfriados até 28° C e pesados (WEI et al., 2001).

#### **4.2.1.4 Fermentação dos grãos de soja para a produção do natto**

A fermentação dos grãos de soja com *B. subtilis* Natto foi realizada segundo Wu e Chou (2009). 5 mL do inóculo, preparado conforme o item 4.2.1.1, foram adicionados a 100 g da soja cozida, misturados cuidadosamente e cobertos com filme plástico perfurado na parte superior. A soja inoculada foi fermentada em Shaker a 25, 35 e 45° C por 12, 24 e 36 h.

### **4.2.2 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISES ESTATÍSTICAS**

Para determinação das condições ótimas de produção do natto foi realizado um planejamento experimental com esquema fatorial 2<sup>3</sup>, com três repetições do ponto central, e três níveis totalizando 17 experimentos (Tabela 1).

Foi avaliada a influência das variáveis independentes  $X_1$  = inóculo (UFC/mL),  $X_2$  = temperatura (° C) e  $X_3$  = tempo de fermentação (h) na atividade de  $\beta$ -glicosidase ( $Y_1$ ), atividade antioxidante ( $Y_2$ ) e teor de isoflavonas agliconas ( $Y_3$ ) (Tabela 1). Os valores dos níveis foram baseados em estudos preliminares e os ensaios foram conduzidos aleatoriamente (Tabela 2).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 10% e plotados os mapas de superfície de resposta utilizando-se o programa STATISTICA 7.0 da StatSoft, Inc, Tulsa, OK, USA (2004).

**Tabela 1:** Matriz do DCC ( $2^3$ ) utilizado para a fermentação da soja com *B. subtilis* Natto

Tratamentos	Inóculo (UFC/mL)	Temperatura (°C)	Fermentação (h)
	$X_1$	$X_2$	$X_3$
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	-1	0	0
10	1	0	0
11	0	-1	0
12	0	1	0
13	0	0	-1
14	0	0	1
15 (C)	0	0	0
16 (C)	0	0	0
17 (C)	0	0	0

**Tabela 2:** Níveis reais e codificados das variáveis independentes para o preparo do natto utilizando o DCC ( $2^3$ )

Variáveis Independentes	Níveis		
	-1	0	1
Quantidade de inóculo (UFC*/mL)	$10^3$	$10^6$	$10^9$
Temperatura (°C)	25	35	45
Tempo de incubação (h)	12	24	36

\* UFC: unidade formadora de colônia.

As funções resposta  $Y_1$  ( $\beta$ -glicosidase),  $Y_2$  (atividade antioxidante) e  $Y_3$  (teor de isoflavonas agliconas) foram avaliadas segundo o modelo matemático expresso na Equação 1.

$$Y = \beta_0 + \beta_1x_1 + \beta_{11}x_1^2 + \beta_2x_2 + \beta_{22}x_2^2 + \beta_3x_3 + \beta_{33}x_3^2 + \beta_{12}x_{12} + \beta_{13}x_1x_3 + \beta_{23}x_{23} + e$$

Onde:

Y= função resposta

x1; x2; x3= variáveis codificadas

$\beta$  = coeficientes estimados pelo modelo de superfície de resposta

e = resíduo (erro experimental)

### 4.2.3 VALIDAÇÃO DO MODELO MATEMÁTICO E PRODUÇÃO DO NATTO EM PÓ

Foram produzidos dois nattsos nas condições de cultivo que apresentaram os maiores valores de atividade antioxidante ( $10^9$  UFC/mL, 45°C e 20 h) e de teor de isoflavonas agliconas ( $10^3$  UFC/mL, 25°C e 12 h). Os nattsos obtidos foram liofilizados e caracterizados segundo sua composição centesimal (item 4.2.4.1), teor de açúcares totais (item 4.2.4.2), teor de isoflavonas (item 4.2.4.3), atividade antioxidante (item 4.2.4.4) e atividade enzimática (item 4.2.4.5).

### 4.2.4 MÉTODOS ANALÍTICOS

Os procedimentos analíticos foram realizados em triplicata.

#### 4.2.4.1 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

O teor de proteínas totais foi determinado pelo método de Kjeldahl, descrito pela AOAC (1975), utilizando o fator de conversão 6,25.

O teor de umidade (estufa a 105° C), cinzas (mufla a 550° C) e lipídeos (extrato soxhlet) foram quantificados segundo metodologia descrita pelo Instituto Adolf Lutz (1985).

O teor de carboidratos totais foi determinado pela diferença em relação às proteínas totais, lipídeos, umidade e cinzas. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

#### 4.2.4.2 DETERMINAÇÃO DE AÇÚCARES TOTAIS

O teor de açúcares totais foi determinado pelo método fenol-sulfúrico segundo Dubois e colaboradores (1956), utilizando solução padrão de D-glicose.

#### 4.2.4.3 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ISOFLAVONAS

- **Extração**

Amostras homogeneizadas e liofilizadas de natto foram moídas e desengorduradas com hexano na proporção 1:10 (m/v) por 30 min à temperatura ambiente com agitação rotativa contínua e filtradas à vácuo. Após evaporação do hexano residual em capela com fluxo de ar as amostras desengorduradas foram mantidas em freezer até a análise. As isoflavonas foram extraídas com uma solução de água-etanol-acetona na proporção 1:1:1 (v/v /v), segundo Yoshiara e colaboradores (2012).

A extração foi realizada utilizando 0,3 g de natto liofilizado, moído e desengordurado com 6 mL da solução extratora e agitação em vortex a cada 15 min durante 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, foram colocadas em banho ultrassônico por 15 min à temperatura ambiente e centrifugadas a 2500 xg por 15 min à 4° C (Centrifuge 5804R – Eppendorf, Hamburg, GE). Após centrifugação as amostras foram filtradas em filtro Millex – LH 0,22 µm.

- **Quantificação**

Alíquotas de 1,4 µL em triplicata das amostras filtradas foram ejetadas automaticamente no Cromatógrafo líquido UPLC<sup>®</sup> Waters. A coluna foi de fase reversa (modelo ACQUITY - UPLC BEH C18, Waters) com dimensão de 2,1 mm x 50 mm, e tamanho de partículas de 1,7 µm. A eluição foi realizada com gradiente não linear, utilizando fase móvel A água acidificada com ácido acético glacial (pH 3,0) e B acetonitrila com fluxo de 0,70 mL/min à 35°C. O gradiente foi iniciado com 90% de eluente A e 10% de eluente B e em 8 min de eluição, o gradiente atingiu a proporção de 0% de A e 100% B, retornando às condições iniciais em 9 min. O tempo total de corrida foi de 10 min. Para a detecção, foi utilizado o detector de arranjo de diodos (Waters) ajustado ao

comprimento de onda de 260 nm. As soluções padrão para a construção das curvas de calibração (área do pico x teor de isoflavonas) foram daidzina, genistina, glicitina, malonil daidzina, malonil genistina, malonil glicitina, acetil daidzina, acetil genistina, acetil glicitina, gliciteína e genisteína (0,1; 0,025; 0,006 e 0,002 mg.mL<sup>-1</sup>) e daidzeína (0,1; 0,025; 0,006; 0,002 e 0,001 mg.mL<sup>-1</sup>). Os padrões em triplicata foram injetados originando os cromatogramas correspondentes e cada forma química de isoflavonas com respectivos tempos de retenção correspondentes. Os picos de cada forma de isoflavonas da amostra foram identificados por comparação dos tempos de retenção e espectros na região UV dos respectivos padrões de referência. O aplicativo acoplado no Cromatógrafo gerou as curvas de calibração e as concentrações de isoflavonas foram calculadas e expressas em mg de isoflavonas por 100g de amostra de natto liofilizado.

#### **4.2.4.4 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

Para determinação da atividade antioxidante foram extraídos os compostos fenólicos das amostras de natto previamente liofilizadas, moídas e desengorduradas. A extração foi realizada com 1,0 g de amostra e 10,0 mL de etanol 80% (v/v), seguido de agitação por 20 min a 200 rpm em temperatura ambiente. O material foi centrifugado a 2500 xg e o sobrenadante coletado. Essa etapa foi repetida mais duas vezes e os sobrenadantes resultantes foram combinados. O extrato contendo os compostos fenólicos livres foi concentrado em rota-evaporador até 10,0 mL e estocado a -26°C até análise.

Para a determinação da capacidade antioxidante foi misturado, em ambiente escuro, 1,0 mL de tampão acetato 0,1 M, pH 5,5; 1,0 mL de etanol absoluto, 0,5 mL do radical DPPH 250 µmol/L e 50,0 µL de amostra. As misturas foram mantidas em repouso no escuro por 30 min a temperatura ambiente e, posteriormente, realizado a leitura da absorvância a 517 nm. Foi utilizado como branco uma solução 1,0 mL de tampão acetato 0,1 M, pH 5,5 com 1,50 mL de etanol absoluto e um controle positivo contendo todas as soluções, exceto a amostra. A quantificação da atividade antioxidante dos extratos foi realizada por meio de uma curva padrão de Trolox (0,5 a 20 µmol/L). Foi realizado um controle positivo para eliminar possível interferência da cor do extrato na análise. Os resultados foram expressos em µM de Trolox por grama de amostra em base seca (µM Trolox/g b.s.).

#### 4.2.4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ENZIMÁTICA

##### 4.2.4.5.1 $\beta$ -glicosidase

Para a determinação da atividade de  $\beta$ -glicosidase foi utilizado o substrato sintético cromogênico  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo ( $p$ -NPG) conforme procedimento descrito por Matsuura e Obata (1993). Foram utilizados tubos de ensaio contendo 2 mL de  $p$ -NPG 1mM, em tampão fosfato-citrato 0,1 M, pH 5,0, mantidos em banho-maria a 30° C por 10 min de pré-incubação. Em sequência, foram adicionados 0,5 mL do extrato e novamente colocados em banho-maria a 30° C por 30 min para incubação. A reação ocorre pela ação da  $\beta$ -glicosidase sobre o substrato liberando  $p$ -NP como um dos produtos de reação. O  $p$ -nitrofenol produz uma cor amarela intensa em solução alcalina e pode ser quantitativamente medido a 420 nm. Portanto, após a reação ser interrompida, pela adição de 2,5 mL de carbonato de sódio 0,5 M, a liberação de  $p$ -NP foi determinada utilizando uma curva padrão (0,01 – 0,11  $\mu$ mol/mL). Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de  $p$ -NP/min nas condições de ensaio.

##### 4.2.4.5.2 Protease

A determinação da atividade de protease foi realizada segundo Germano *et al.* (2003). A enzima foi extraída da amostra, previamente liofilizada, com solução contendo NaCl 1%, em agitação constante a 28° C por 20 min. Após filtração e centrifugação, 0,25 mL do extrato enzimático obtido foi colocado em tubos de ensaio de 10 mL, contendo 0,5 mL de solução 0,5% albumina de soro bovino (ASB) e 0,25 mL de solução tampão fosfato 0,2 M, pH 7,0. A mistura foi mantida sob agitação de 100 rpm por 20 min a 50°C em incubadora Shaker. Após este período, foi adicionado 2,5 mL de solução TCA (ácido tricloroacético) 10% e 0,7 mL de solução NaOH 1N. As amostras foram centrifugadas por 20 min a 2500  $xg$  e o sobrenadante obtido foi analisado por espectrofotometria a 440 nm. Uma unidade de atividade de protease (U) foi definida como a quantidade de enzima que produziu uma variação na medida de absorbância (em relação ao branco)

nas condições da análise, para 20 min de incubação por 1 g de massa seca (gms) da amostra sólida ( $U = \text{Abs}/\text{min gms}$ ).

#### 4.2.4.5.3 Lipase

A enzima com atividade de lipase foi extraída do natto liofilizado com tampão TRIS – HCl, 5mM, pH 7,0, na proporção 1:5 (m/v). Após agitação em Shaker a 200 rpm por 30 min, a amostra foi filtrada e centrifugada a 1600 xg por 5 min.

A determinação da atividade foi realizada segundo metodologia descrita por Winkler e Stukmann (1979), modificada por Lima (2004), que utiliza o palmitato de  $\rho$ -nitrofenila como substrato, em meio aquoso, e a goma arábica e o Triton X-100 como surfactante. A formação do  $\rho$ -nitrofenol ( $\rho$ -NP) foi quantificada em espectrofotômetro a 410 nm. Uma unidade de enzima com atividade de lipase foi definida como a liberação de 1  $\mu\text{mol}$  de  $\rho$ -NP por min. A atividade da enzima foi calculada a partir do coeficiente de absortividade molar do  $\rho$ -NP, obtido a partir de uma curva padrão (0,002 – 0,2  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ) realizada nas condições do ensaio. Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de  $\rho$ -NP/min nas condições de ensaio.

#### 4.2.4.5.4 Celulase

A enzima com atividade de celulase foi extraída de 1g da amostra de natto liofilizado com 17 mL de tampão fosfato de sódio, 50 mM, pH 7,0. Após 30 min de agitação em Shaker a 300 rpm a 35° C, a amostra foi filtrada e centrifugada a 2500 rpm por 20 min.

A determinação de atividade foi realizada com pedaços de papel filtro (1 x 12 cm), cortados, enrolados e colocados no fundo de tubos de ensaio de 20 mL. Aos tubos foram adicionados 2 mL de solução-tampão acetato 50 mM, pH 5,0 e 1 mL de amostra de extrato enzimático, mantidos em banho Maria a 50° C por 1h, com agitação manual dos tubos em intervalos de 10 min (PARIS, 2008). Após resfriar, a atividade da enzima foi medida pelo método do ácido 3,5-dinitrosalicílico - DNS (Miller, 1959), com 1,4 mL da amostra adicionados a 1,4 mL do reagente DNS, em tubos de ensaio de 25 mL. Os tubos, contendo as amostras e o DNS, foram

levados a um banho fervente por 5 min e, em seguida, resfriados em banho de gelo. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (UV-Vis), em 540 nm. O branco foi preparado pela adição de 1,0 mL de água deionizada substituindo o extrato de enzima. A curva padrão de glicose (100 µg/mL) foi construída nas mesmas condições da análise.

Uma unidade de atividade celulásica (U) foi definida como a quantidade de µmol de açúcares redutores (AR) liberados por min/g de massa seca da amostra, nas as condições de ensaio (U = µmol AR/min gms).

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os resultados e a discussão deste trabalho foram redigidos no formato de artigos científicos.

## 5.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1

Título: Influência das condições de fermentação dos grãos de soja cultivar BRS 216 com *Bacillus subtilis* Natto nas características físicas do natto.

# Influência das condições de fermentação de grãos de soja cultivar BRS 216 com *Bacillus subtilis* Natto nas características físicas do natto

R. F. C. Badini, et al.

*Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rod. Celso Garcia Cid, Km 380, CP 6001 – 95070-560 Londrina – PR, Brasil.*

## Resumo

O natto é um alimento típico oriental composto por grãos de soja fermentados com a bactéria *Bacillus subtilis* Natto. Considerado um alimento proteico e de elevado valor nutritivo suas características são fortemente influenciadas pelo modo de preparo. O presente trabalho tem como objetivo investigar o efeito de diferentes quantidades de inóculo ( $10^3$  –  $10^9$  UFC/mL), de temperaturas (25 – 45°C) e de tempos de fermentação (12 – 36 h) na elaboração de natto, utilizando um Delineamento Composto Central ( $2^3$ ). Foram avaliadas as características visuais e o teor de umidade em cada ensaio. O natto obtido após 12 h de fermentação a 25°C não apresentou viscosidade e aroma característico, independente da quantidade de inóculo. O aumento do tempo de fermentação para 24 e 36 h a 25°C acarretou na formação de uma película esbranquiçada sobre os grãos, sendo esta mais espessa conforme o aumento de inóculo de  $10^3$  a  $10^9$ . As características típicas de viscosidade e aroma do natto foram observadas em 24 h de fermentação a 35°C e 45°C, apresentando maior viscosidade com o aumento do inóculo.

*Palavras chave:* fermentação, soja, natto, textura, *Bacillus subtilis* Natto

## Introdução

Desde os tempos antigos, nas culturas mais tradicionais, os alimentos fermentados tem sido uma fonte de nutrição valorizada. Dentre eles, os produtos a base de soja têm um importante papel nutricional como fonte de proteínas.

Natto é um alimento tradicional composto por grãos de soja fermentados com a bactéria *Bacillus subtilis* Natto e muito apreciado no norte do Japão. Pode ser usado como condimento para enriquecer pratos com carnes, frutos do mar e vegetais (WEI et al., 2001) fazendo parte de pratos orientais tradicionais como *sushi*, *temaki* ou sopa de misô; consumidos com arroz cozido e cebolinha; ou até mesmo em receitas doces.

O processo de produção do natto é relativamente simples e geralmente inclui etapas como lavagem dos grãos, cozimento, inoculação e incubação (STEINKRAUS, 1983; OHTA 1986; MARUO; YOSHKAWA 1989). As condições e combinações de cada etapa influenciam na qualidade final do produto (MATSUMOTO et al., 1993; WEI et al., 2001). O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito de diferentes quantidades de inóculo (UFC/mL), de temperaturas (°C) e de tempos de fermentação (h) na produção de natto, por análise visual da mudança de textura e do aroma característico, e determinação do teor de umidade.

## Materiais e métodos

### *Matéria-prima*

Os grãos de soja da cultivar BRS 216, desenvolvida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Soja) – Londrina/PR, foram utilizados para a produção do natto. Os grãos foram submetidos à uma seleção prévia para a remoção de danificados ou manchados e de materiais estranhos.

Como inóculo foi utilizado a *B. subtilis* Natto isolado no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina, identificada pela Fundação André Tosello, São Paulo/SP, (CCT 7712).

Os reagentes foram de grau de pureza analítica de diferentes procedências comerciais.

### *Métodos*

#### *Preparo do inóculo*

A metodologia empregada para o preparo do inóculo de *B. subtilis* Natto foi descrita por Hu e colaboradores (2010). O *B. subtilis* Natto foi preservado em meio de cultivo contendo (g/L): peptona, 50; extrato de carne, 30; e ágar, 60, incubado a 37° C por 48 h e estocado a 4° C. A cepa em ágar inclinado foi transferida e cultivada em 10 mL de caldo nutriente (NB) composto por peptona, 5 g/L, e extrato de carne, 3 g/L. Após 48 h a 37° C, o cultivo foi centrifugado a 5000 xg por 10 min e o pellet de células ressuspenso em 5 mL de água estéril contendo 8,5 g/L de NaCl, pH 7 e, posteriormente, diluído até a população viável necessária, conforme experimentos.

A contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) da bactéria foi realizada em microscópio, utilizando Câmara de Neubauer, e associada a diluições do meio de cultivo líquido por meio de uma curva de turbidimetria, segundo Ernandes (2009).

#### *Teste de dureza nos grãos cozidos*

A dureza dos grãos de soja foi medida em um texturômetro (Stable Micro Systems, modelo TA.XT *plus* Texture Analyser, Surrey, UK), segundo descrito por Mori (2001), com algumas modificações, na qual as amostras hidratadas e cozidas em autoclave, a 121° C, por 10, 20, 30 e 40 min foram comprimidas a 25% da altura inicial com uma força de 0,05N, utilizando um cilindro de compressão à velocidade de 2 mm/s com probe SMS PI25L. Uma amostra de natto comercial também foi testada para comparação.

#### *Preparo dos grãos de soja para a fermentação*

Os grãos de soja, após a remoção de impurezas foram lavados, embebidos em água à temperatura ambiente (28° C) por aproximadamente 14 h, até o dobro do peso inicial e, em seguida, drenados. Os grãos hidratados foram cozidos no vapor a 121° C (1kg/cm<sup>2</sup>) por 20 min em autoclave. Os grãos cozidos foram imediatamente cobertos com uma folha de alumínio, resfriados até 28° C e pesados (WEI et al., 2001).

#### *Fermentação dos grãos de soja para a produção do natto*

A fermentação foi realizada segundo Wu e Chou (2009). Cinco mililitros do inóculo foram adicionados a 100 g da soja cozida, misturados cuidadosamente e cobertos com filme plástico perfurado na parte superior. A soja inoculada foi fermentada em Shaker a 25, 35 e 45° C por 12, 24 e 36 horas.

#### *Determinação do teor de umidade*

O teor de umidade foi realizado por secagem em estufa a 105° C até peso constante, segundo metodologia descrita pelo Instituto Adolf Lutz (1985).

#### *Análise das características visuais do natto*

Foram avaliados visualmente a mudança de textura e o aroma dos natts produzido segundo o DCC (2<sup>3</sup>). Foi utilizado como controle grãos de soja *in natura* (Controle 1) e soja hidratada, cozida e não inoculada (Controle 2) da cultivar BRS 216.

### *Delineamento Experimental e Análises Estatísticas*

Para avaliar a influência das condições de fermentação nas características visuais e no teor de umidade do natto foi realizado um planejamento experimental com esquema fatorial  $2^3$ , com três repetições do ponto central, e três níveis totalizando 17 ensaios (Tabela 1).

As variáveis independentes foram quantidade de inóculo ( $X_1 = \text{UFC/mL}$ ), temperatura ( $X_2 = ^\circ\text{C}$ ) e tempo de fermentação ( $X_3 = \text{h}$ ). A tabela 1 apresenta os níveis reais e codificados de variação das variáveis estudadas.

Os valores dos níveis utilizados foram baseados em estudos preliminares e os ensaios foram conduzidos aleatoriamente

**Tabela 1:** Níveis codificados e reais das variáveis independentes testadas utilizando DCC ( $2^3$ )

Tratamentos	Inóculo (UFC*/mL)		Temperatura ( $^\circ\text{C}$ )		Fermentação (h)	
	$X_1$		$X_2$		$X_3$	
	Codificada	Real	Codificada	Real	Codificada	Real
1	-1	$10^3$	-1	25	-1	12
2	-1	$10^3$	-1	25	1	36
3	-1	$10^3$	1	45	-1	12
4	-1	$10^3$	1	45	1	36
5	1	$10^9$	-1	25	-1	12
6	1	$10^9$	-1	25	1	36
7	1	$10^9$	1	45	-1	12
8	1	$10^9$	1	45	1	36
9	-1	$10^3$	0	35	0	24
10	1	$10^9$	0	35	0	24
11	0	$10^6$	-1	25	0	24
12	0	$10^6$	1	45	0	24
13	0	$10^6$	0	35	-1	12
14	0	$10^6$	0	35	1	36
15 (C)	0	$10^6$	0	35	0	24
16 (C)	0	$10^6$	0	35	0	24
17 (C)	0	$10^6$	0	35	0	24

\* UFC: unidade formadora de colônia.

## **Resultados e Discussão**

### *Características dos grãos*

A cultivar BRS 216 apresenta grãos com hilo amarelado e tamanho pequeno, com dimensões média de 5,83 mm x 5,48 mm x 4,94 mm e peso médio de 11,54 g/100 grãos, sendo ideal para a produção do natto.

### *Teste de dureza*

Os valores médios obtidos no teste de dureza para amostras cozidas a  $121^\circ\text{C}$  estão dispostos na Tabela 2.

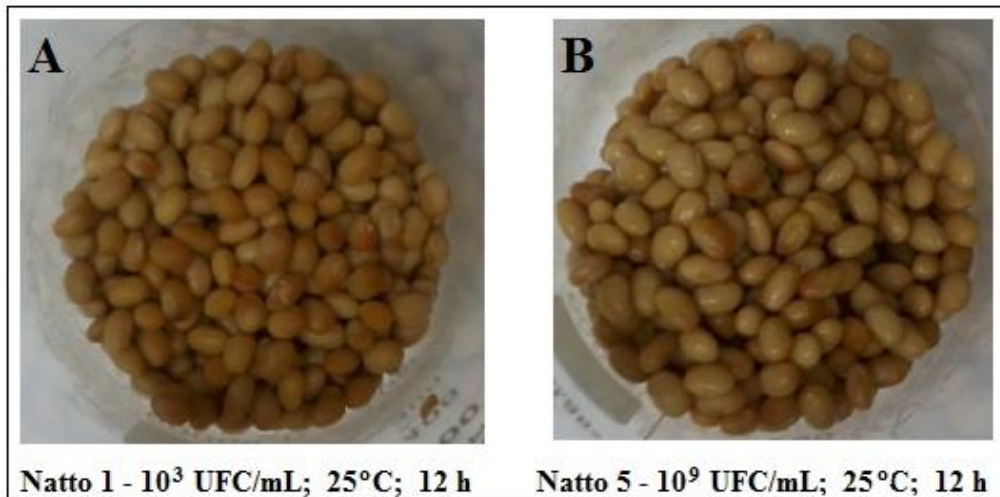
O valor obtido para o natto comercial foi de  $2,63 \pm 0,3259\text{ N}$ , justificando a escolha de 20 min de cozimento para o preparo do natto no restante do experimento.

**Tabela 2:** Valores médios de dureza determinados nas amostras de soja cozida

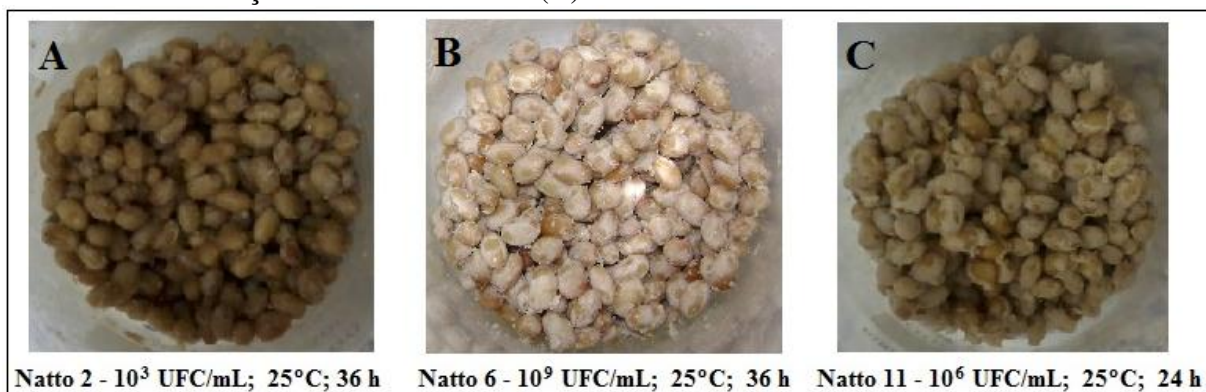
Tempo de cozimento (min)	Dureza (N)
10	3,30 ± 0,39
20	2,63 ± 0,33
30	2,69 ± 0,23
40	1,43 ± 0,12

*Características visuais do natto produzido em diferentes condições de fermentação*

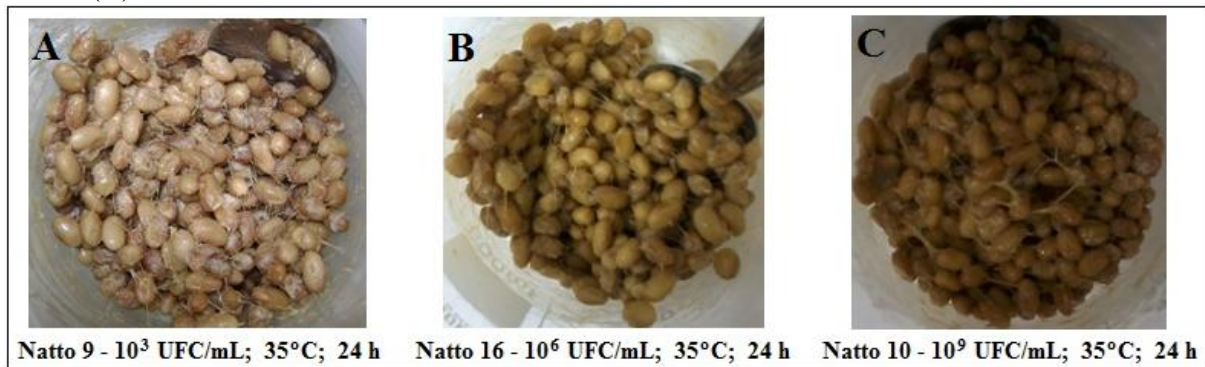
Em relação às características físicas, o natto obtido após 12 h de fermentação a 25° C não apresentou viscosidade e aroma característico, independente da quantidade de inóculo, em relação ao natto obtido de fontes comerciais (Figura 1). O aumento do tempo de fermentação para 24 e 36 h a 25° C acarretou na formação de uma película esbranquiçada sobre os grãos, sendo esta mais espessa conforme o aumento de inóculo de  $10^3$  a  $10^9$  (Figura 2).

**Fig. 1:** Natto obtido após 12 h de fermentação a 25° C com  $10^3$  UFC/mL (A) e  $10^9$  UFC/mL (B)

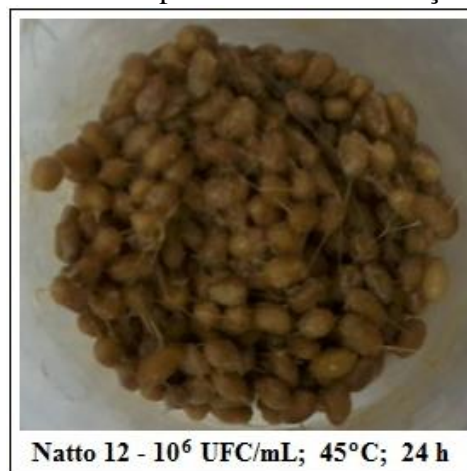
As características típicas de textura e aroma do natto, em relação ao produto comercial, foram observadas em 24 h de fermentação a 35° C e 45° C (Figuras 3 e 4); apresentando uma maior mudança da textura com o aumento do inóculo.

**Fig. 2:** Natto obtido após 36 h de fermentação a 25° C com  $10^3$  UFC/mL (A) e  $10^9$  UFC/mL (B); e após 24 h de fermentação com  $10^6$  UFC/mL (C)

**Fig. 3:** Natto obtido a 35° C após 24 h de fermentação com  $10^3$  UFC/mL (A),  $10^6$  UFC/mL (B)  $10^9$  UFC/mL (C)



**Fig. 4:** Natto obtido a 45° C após 24 h de fermentação com  $10^6$  UFC/mL

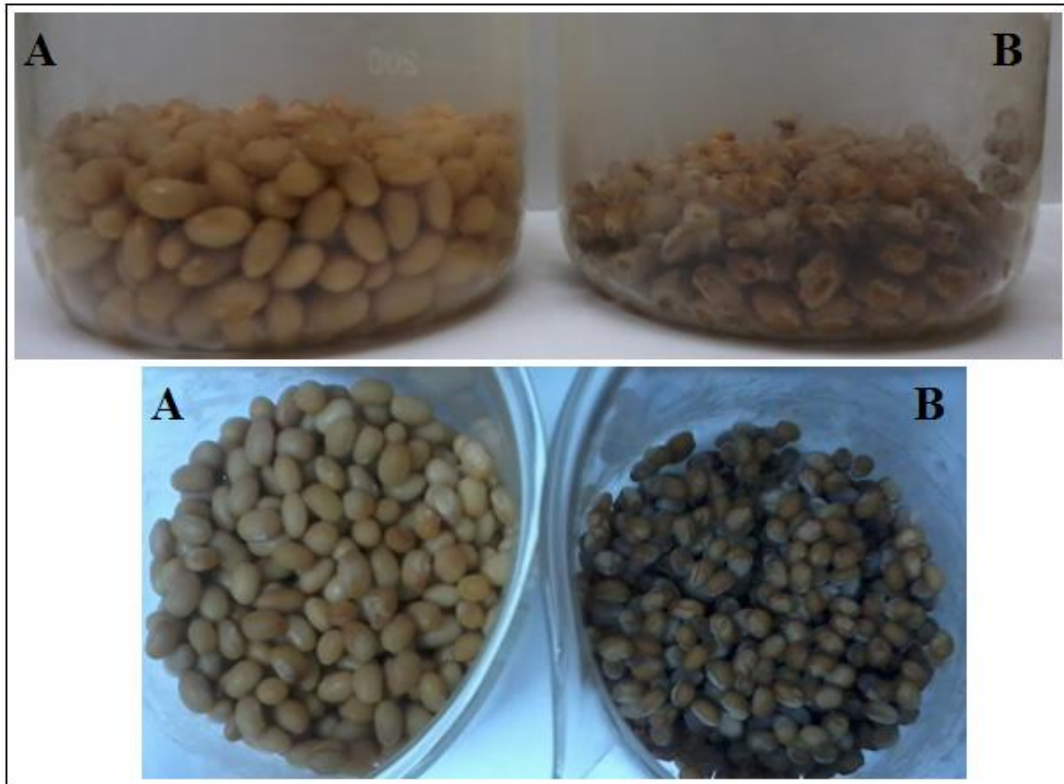


O natto 10 ( $10^9$  UFC/mL, 35° C de fermentação por 24 h) apresentou a maior viscosidade e o melhor aroma entre os natto produzidos. Entretanto, a fermentação da soja a 45° C por 36 h resultou em um natto com aspecto torrado devido a diminuição de umidade, de 124% para 37% (Figura 5).

Matsumoto e colaboradores (1993) indicaram como condições adequadas para uma boa fermentação a temperatura de 35° C, com a inóculo de  $10^4$  a  $10^6$  células/g, ou a 40° C, com  $10^2$  a  $10^4$  células/g de inóculo. Também concluíram que, visando a aparência, cor e dureza do produto, foram suficientes 18 a 20 h de fermentação.

Wei e colaboradores (2001) analisaram a influência do tempo de cozimento nas características do natto e observaram que 40 min de cozimento, um inóculo de  $10^6$  a  $10^7$  UFC/g (em base úmida) e 18 h de fermentação foram condições adequadas para a obtenção de um natto de qualidade, isto é, com alta viscosidade, maciez e aroma moderado.

**Fig. 5:** Comparação entre a soja cozida não inoculada (controle 1) (A) e o natto 8, fermentado a 45° C por 36 h com 10<sup>9</sup> UFC/mL (B)



#### *Teor de umidade do natto produzido*

Durante o preparo do natto foram realizadas pesagens dos grãos para monitoramento da umidade nas etapas: inicial, padronizado em 50g (1); após o molho por 14 h (2); após cozimento (3); após inoculação (4) e após fermentação (5). A variação do peso dos grãos de soja durante as etapas de preparo do natto e o teor de umidade dos nattos obtidos e dos controles (em vermelho) pode ser observado nos Gráficos 1 e 2.

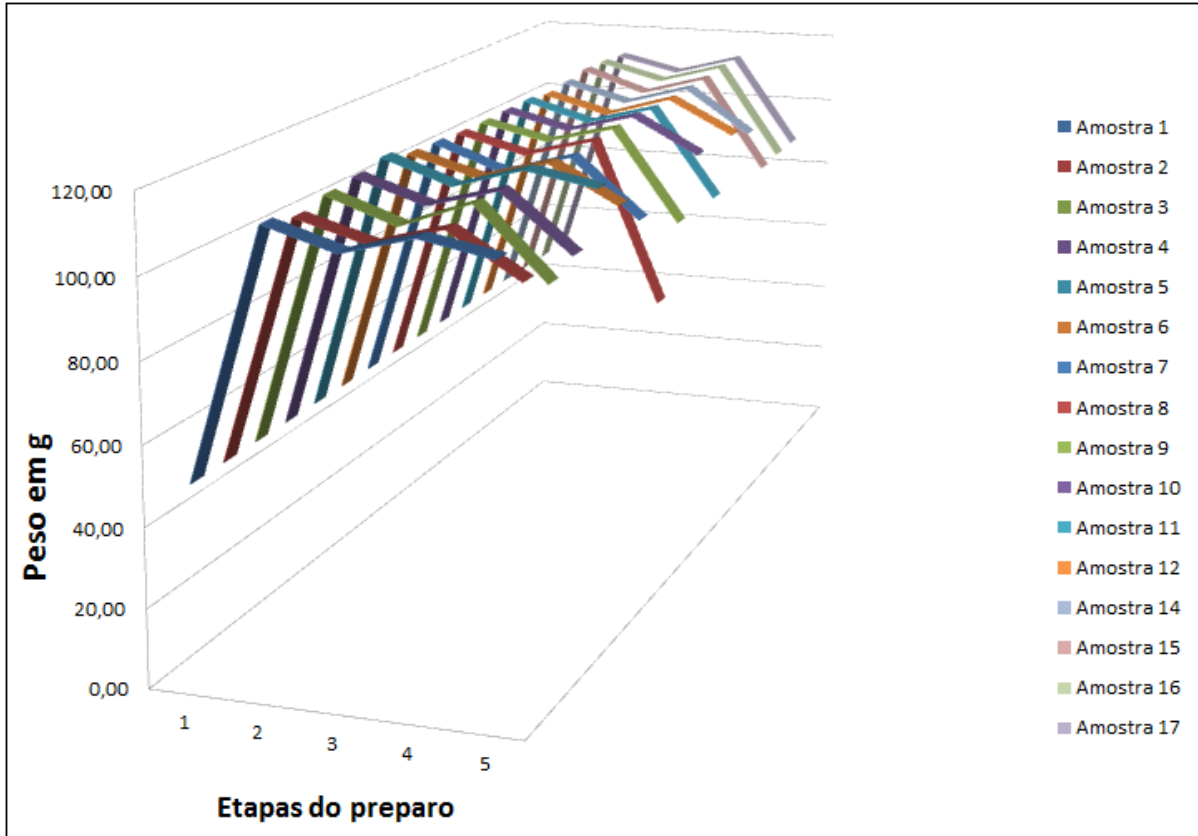
O aumento do peso na etapa de hidratação representa um atributo esperado no grão. Taira (1990) propôs que uma elevada absorção de água nos grãos é necessária para se obter um grão cozido macio o que leva à uma textura ideal. Geater e colaboradores (2000) estudaram a influência de diferentes cultivares, de diferentes safras e locais de cultivo na qualidade do natto. A absorção de água nos grãos, a perda de água após cozimento em vapor e a dureza após cozimento influenciaram significativamente nas características finais do natto.

A umidade é considerada essencial para a qualidade final do produto, uma vez que a viscosidade característica está relacionada a essa variável (WEI et al., 2001; ROSA, 2009; HU et al., 2010).

Como observado visualmente, o natto 8 (Figura 5 B) apresentou o menor teor de umidade devido a exposição prolongada a maior temperatura estudada (45° C). O teor de umidade da soja *in natura* (Controle 1) foi de 13,01 ± 0,29 % valor superior ao observado por Benassi e colaboradores (2011) de 10,51 ± 0,08 %. Esta diferença pode ser atribuída à safras diferentes. A soja hidratada, cozida e não inoculada (Controle 2) apresentou um teor de umidade esperado com pouca perda de água após cozimento no vapor, conferindo uma característica ideal do grão para produção de um natto de qualidade.

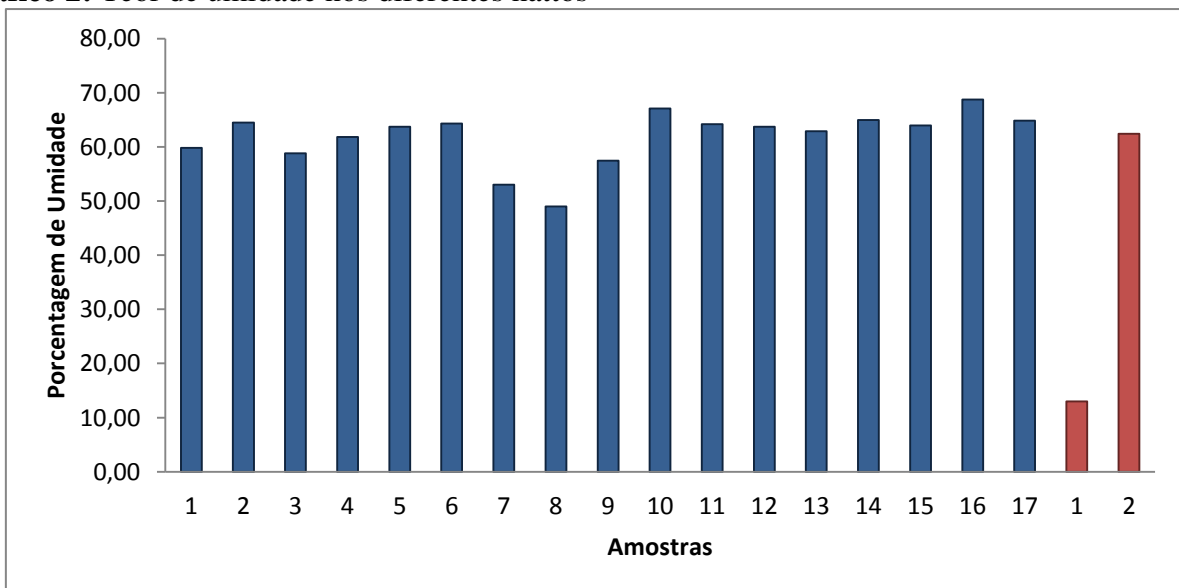
O natto 10 ( $10^9$  UFC/mL, 35° C de fermentação por 24 h) apresentou um elevado teor de umidade, 67,09%, e não apresentou queda do peso após fermentação, outra característica de interesse colocando em destaque no experimento.

**Gráfico 1:** Peso dos grãos de soja durante o preparo do natto



Legenda: Cada amostra refere-se ao natto fermentado nas condições do respectivo ensaio, descritas no DCC ( $2^3$ ) (Tabela 1). Etapas de pesagem: inicial, padronizado em 50g (1); após o molho por 14 h (2); após cozimento (3); após inoculação (4) e após fermentação (5).

**Gráfico 2:** Teor de umidade nos diferentes nattos



Legenda: As colunas azuis das amostras refere-se ao natto fermentado nas condições do respectivo ensaio, descritas no DCC ( $2^3$ ) (Tabela 1). As colunas em vermelho se referem aos controles: 1 soja *in natura* e 2 soja cozida não inoculada.

## Conclusão

Por meio deste experimento foi possível observar visualmente a mudança das características típicas do natto, como textura e aroma, frente às diferentes combinações de inóculo (UFC/mL), temperatura de fermentação (°C) e tempo de incubação (h), realizadas segundo um Delineamento Composto Central. O natto produzido com  $10^9$  UFC/mL, 24 h de fermentação a 35° C, apresentou a maior mudança de textura e do aroma entre os natts produzidos, ficando visualmente semelhante ao natto comercial, sendo um produto interessante para pesquisas posteriores.

## Agradecimentos

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Profa. Dra Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi pela doação da cepa de *Bacillus subtilis* Natto para a execução deste trabalho.

## Referências

- GEATER, C. W., FEHR, W. R.; WILSON, L. A.. Association of Soybean Seed Traits with Physical Properties of Natto. **Crop Science**, v. 40, 2000.
- HU, Y.; GE, C.; YUAN, W.; ZHU, R.; ZHANG, W.; DUC, L. E XUEB, J. Characterization of fermented black soybean natto inoculated with *Bacillus natto* during fermentation. **Journal of Science Food and Agricultural**, v 90, p 1194–1202, 2010.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, p. 21-22. 1985.
- MARUO, B.; YOSHKAWA, H. Ed. 1989. Industrial application of *B subtilis*. Capítulo 8 em Topics in Secondary Metabolism I *Bacillus subtilis*: Molecular Biology and Industrial Application. Maruo, B. and Yoshkawa, H. Ed. New York: Elsevier Science Publishing Co. Inc. p. 143–161,1989.
- MATSUMOTO, I.; AKIMOTO, T.; IMAI, S. Effects of temperature and inoculum size on natto's appearance number of *B natto* temperature hardness and color tone during fermentation. **J Japanese Society of Food Science and Technology**. v. 40, p.75–82, 1993.
- OHTA T. Natto. Capítulo 5 em *Legume-based Fermented Foods* NR Reddy MD Pierson. D Merle, DK Salunkhe, CRC Press. p. 85-93, 1986.
- STEINKRAUS, K. H. Indigenous fermented amino acid/peptide sauces and pastes with meatlike flavors: Chinese soy sauce Japanese shoyu Japanese miso southeast Asian fish sauces and pastes and related foods, seção 5 in Handbood of Indigenous Fermented Foods Microbiology series, v. 9 p. 530–547, 1983.
- ROSA, A. M.; CLAVISO, J.; PASSOS, L. M. L.; AGUIAR, C. L. Alimentos fermentados à base de soja (*Glycine max* (Merrill) L.): importância econômica, impacto na saúde e efeitos associados às isoflavonas e seus açúcares. **Revista brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v 7, n 4, p. 454-462, 2009.
- TAIRA, H. Quality of soybean for processed foods in Japan. **JARQ**, n 24, p. 224-230, 1990.
- WEI, Q.; HALL, W.; CHANG, K.C. Natto characteristics as affected by steaming time, *Bacillus* strain, and fermentation time. **Journal of food science**, v 66, n 1, p. 167-173, 2001.
- WU, C. and CHOU, C. Enhancement of Aglycone, Vitamin K2 and Superoxide Dismutase Activity of Black Soybean through Fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC 14715 at Different Temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v 57, n 22, p. 10695–10700, 2009.

## 5.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2

Título: Produção de Natto em Pó com elevado teor de isoflavonas agliconas por Fermentação de Grãos de Soja com *Bacillus subtilis* Natto, Food and Bioprocess Technology.

# PRODUÇÃO DE NATTO EM PÓ COM ELEVADO TEOR DE ISOFLAVONAS AGLICONAS POR FERMENTAÇÃO DE GRÃOS DE SOJA COM *Bacillus subtilis* Natto

Renata Ferreira Colli Badini; et al.

**Resumo** O Natto é um alimento obtido pela fermentação de grãos de soja pela bactéria *Bacillus subtilis* Natto. Por ser um alimento de soja agrega suas características, como alto teor de proteínas, vitaminas, minerais e fibras, e devido a fermentação também apresenta melhor digestibilidade, diminuição de compostos causadores da flatulência, enriquecimento com compostos funcionais, além de proporcionar sabor e aroma únicos. Porém, suas características visuais diminuem sua aceitação pelos ocidentais. O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito do inóculo, da temperatura e do tempo de fermentação na elaboração de natto em pó enriquecido com isoflavonas agliconas por fermentação de grãos de soja com *Bacillus subtilis* Natto utilizando um Delineamento Composto Central (2<sup>3</sup>) com variação do inóculo de 10<sup>3</sup> – 10<sup>9</sup> UFC/mL, da temperatura de 25 – 45° C e do tempo de fermentação de 12 – 36 h. A condição que resultou no natto com o maior teor de isoflavonas agliconas, 33,34 mg/100g, foi de 10<sup>3</sup> UFC/mL, 25° C e 12 h de fermentação. O natto em pó produzido nestas condições apresentou 64,20% de umidade, 11,30 µg/g de açúcares totais, 18,95% de proteínas, 11,78% de lipídeos, 1,43% de cinzas e 67,84% de carboidratos totais. Também foram determinadas enzimas com atividade de protease de 0,1381 U/g, de lipase de 13,058 U/g e de celulase de 0,4353 U/g no natto em pó.

Mara Lucia Luiz Ribeiro (✉)

Programa de Pós graduação em Biotecnologia, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rod. Celso Garcia Cid, Km 380, CP 6001 – 95070-560 Londrina – PR, Brasil.

E-mail: maraluciaribeiro@uel.br

**Palavras chave** Natto • Fermentação • Soja • Isoflavonas agliconas

## Introdução

A soja (*Glycine max* (L.) Merrill) é uma das *commodities* agrícolas mais importante e valiosa no grupo das leguminosas, por sua composição diferenciada.

A relação entre o consumo de soja e a saúde humana tem sido estudada pelas características nutricionais desse alimento, isto é, pelo elevado teor de proteínas, teor significativo de minerais e fibras, quantidade reduzida de gordura saturada e a ausência de colesterol, além da presença de compostos polifenólicos, como as isoflavonas (SILVA et al., 2006).

As isoflavonas da soja são compostos originários do metabolismo secundário, com estrutura química fenólica, e que estão amplamente distribuídas no reino vegetal nas formas agliconas (daidzeína, genisteína, gliciteína), glicosiladas (daidzina, genistina, glicitina), malonilglicosiladas (6''-O-malonildaizina, 6''-O-malonilgenistina, 6''-O-malonilglicitina) e acetilglicosilada (6''-O-acetildaizina, 6''-O-acetilgenistina, 6''-O-acetilglicitina) (VILLARES et al., 2011).

No processo de fermentação pode-se obter alimentos com sabor, aroma e textura diferenciados (STEINKRAUS, 2002; RAGHUVANSHI; SINGH, 2009; HU et al., 2010). Este também permite o enriquecimento com aminoácidos e ácidos graxos essenciais, vitaminas, açúcares, antioxidantes e fitoesteróis, além de aumentar a disponibilidade e a assimilação de nutrientes no organismo.

O Natto é um alimento típico oriental composto por grãos de soja fermentados com a bactéria *B. subtilis* Natto. Apresenta sabor adstringente e um odor característico assim como uma textura viscosa que recobre os grãos (WEI et al., 2001).

Seu processo de produção é relativamente simples e geralmente inclui etapas como

lavagem dos grãos, cozimento, inoculação e incubação (STEINKRAUS, 1983; OHTA 1986; MARUO; YOSHKAWA 1989).

O processo fermentativo auxilia na conversão de isoflavonas glicosiladas acumulando a forma aglicona no produto final (PYO et al., 2005; CHOI et al., 2007; VILLARES et al., 2011), por esta razão as etapas de inoculação e incubação apresentam grande influência sobre o teor e as formas de isoflavonas no natto.

O objetivo deste trabalho foi investigar o efeito de diferentes quantidades de inóculo, temperaturas e tempos de fermentação na elaboração de natto em pó com elevado teor de isoflavonas agliconas utilizando um Delineamento Composto Central (2<sup>3</sup>).

## Materiais e Métodos

### Matéria-Prima

Foram utilizados grãos de soja da cultivar BRS 216, desenvolvida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Soja) – Londrina/PR, Brasil, para a produção do natto. Os grãos foram submetidos à uma seleção prévia.

A cepa utilizada de *B. subtilis* Natto (CCT 7712) foi isolada no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina PR, Brasil, identificada pela Fundação André Tosello, São Paulo, SP, Brasil.

### Preparo do inóculo

A metodologia empregada para o preparo do inóculo de *B. subtilis* Natto foi descrita por Hu e colaboradores (2010). A *B. subtilis* Natto foi preservada em meio de cultivo contendo (g/L): peptona, 50; extrato de carne, 30; e ágar, 60, incubado a 37° C por 48 h e estocado a 4° C. A cepa em ágar inclinado foi transferida e cultivada em 10 mL de caldo nutriente (NB) composto por peptona, 5 g/L, e extrato de carne, 3 g/L. Após 48 h a 37° C, o cultivo foi centrifugado a 5000 xg por 10 min e o pellet de células ressuspenso em 5 mL de água estéril contendo 8,5 g/L de NaCl, pH 7 e,

posteriormente, diluído até a população viável necessária, conforme experimentos.

A contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) da bactéria foi realizada em microscópio, utilizando Câmara de Neubauer, e associada a diluições do meio de cultivo líquido por meio de uma curva de turbidimetria, segundo Ernandes (2009).

### Preparo da soja

Os grãos de soja foram lavados, embebidos em água à temperatura ambiente (28° C) por aproximadamente 14 h, até o dobro do peso inicial e, em seguida, drenados. Os grãos hidratados foram cozidos no vapor a 121° C (1kg/cm<sup>2</sup>) por 20 min em autoclave. O tempo de cozimento foi determinado após teste preliminar de dureza comparando-se com o natto comercial. Os grãos cozidos foram imediatamente cobertos com uma folha de alumínio, resfriados até 28° C e pesados (WEI et al., 2001).

### Produção do Natto

A fermentação dos grãos de soja com *B. subtilis* Natto foi realizada segundo Wu e Chou (2009). Cinco mililitros do inóculo foram adicionados a 100 g da soja cozida, misturados cuidadosamente e cobertos com filme plástico perfurado na parte superior. A soja inoculada foi fermentada em Shaker a 25, 35 e 45° C por 12, 24 e 36 horas.

### Delineamento experimental e análises estatísticas

Para determinação das condições ótimas de produção do natto com elevado teor de isoflavonas agliconas foi realizado um planejamento experimental com esquema fatorial 2<sup>3</sup>, com três repetições do ponto central, e três níveis, totalizando 17 ensaios (Tabela 1).

Foi avaliada a influência das variáveis independentes X<sub>1</sub> = inóculo (UFC/mL), X<sub>2</sub> = temperatura (° C) e X<sub>3</sub> = tempo de fermentação (h) no teor de isoflavonas agliconas (mg/100g).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com nível de

significância de 10% e plotados os mapas de superfície de resposta utilizando-se o programa STATISTICA 7.0 da StatSoft, Inc, Tulsa, OK, USA (2004).

O natto produzido na melhor condição de preparo para obtenção de elevado teor de isoflavonas agliconas foi homogeneizado, liofilizado, moído e congelado até análise.

#### Determinação da composição centesimal

O teor de proteínas totais foi determinado pelo método de Kjeldahl, descrito pela AOAC (1975), utilizando o fator de conversão 6,25.

O teor de umidade (estufa a 105° C), cinzas (mufla a 550° C) e lipídeos (extrato soxhlet) foram quantificados segundo metodologias descritas pelo Instituto Adolf Lutz (1985).

O teor de carboidratos totais foi determinado pela diferença em relação às proteínas totais, lipídeos, umidade e cinzas. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

#### Determinação de açúcares totais

Os açúcares totais foram determinados pelo método fenol-sulfúrico segundo Dubois et al. (1956), utilizando solução padrão de D-glucose.

#### Determinação do teor de isoflavonas

Amostras homogeneizadas e liofilizadas de natto foram moídas e desengorduradas com hexano na proporção 1:10 (m/v) por 30 min à temperatura ambiente com agitação rotativa contínua e filtradas à vácuo. Após evaporação do hexano residual em capela com fluxo de ar as amostras desengorduradas foram mantidas em freezer até a análise. As isoflavonas foram extraídas com uma solução de água-etanol-acetona na proporção 1:1:1 (v/v /v), segundo Yoshiara e colaboradores (2012).

A extração foi realizada utilizando 0,3 g de natto liofilizado, moído e desengordurado com 6 mL da solução extratora e agitação em vortex a cada 15 min durante 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, foram colocadas em banho ultrassônico por 15 min à temperatura ambiente e centrifugadas a 2500 xg por 15 min à 4° C (Centrifuge 5804R – Eppendorf,

Hamburg, GE). Após centrifugação as amostras foram filtradas em filtro Millex – LH 0,22 µm.

Alíquotas de 1,4 µL em triplicata das amostras filtradas foram ejetadas automaticamente no Cromatógrafo líquido UPLC® Waters. A coluna foi de fase reversa (modelo ACQUITY - UPLC BEH C18, Waters) com dimensão de 2,1 mm x 50 mm, e tamanho de partículas de 1,7 µm. A eluição foi realizada com gradiente não linear, utilizando fase móvel A água acidificada com ácido acético glacial (pH 3,0) e B acetonitrila com fluxo de 0,70 mL/min à 35°C. O gradiente foi iniciado com 90% de eluente A e 10% de eluente B e em 8 min de eluição, o gradiente atingiu a proporção de 0% de A e 100% B, retornando às condições iniciais em 9 min. O tempo total de corrida foi de 10 min. Para a detecção, foi utilizado o detector de arranjo de diodos (Waters) ajustado ao comprimento de onda de 260 nm.

As soluções padrão para a construção das curvas de calibração (área do pico x teor de isoflavonas) foram daidzina, genistina, glicitina, malonil daidzina, malonil genistina, malonil glicitina, acetil daidzina, acetil genistina, acetil glicitina, gliciteína e genisteína (0,1; 0,025; 0,006 e 0,002 mg.mL<sup>-1</sup>) e daidzeína (0,1; 0,025; 0,006; 0,002 e 0,001 mg.mL<sup>-1</sup>). Os padrões em triplicata foram injetados originando os cromatogramas correspondentes e cada forma química de isoflavonas com respectivos tempos de retenção correspondentes. Os picos de cada forma de isoflavonas da amostra foram identificados por comparação dos tempos de retenção e espectros na região UV dos respectivos padrões de referência. O aplicativo acoplado no Cromatógrafo gerou as curvas de calibração e as concentrações de isoflavonas foram calculadas e expressas em mg de isoflavonas por 100g de amostra de natto liofilizado.

#### Determinação de enzima com atividade de Protease

A determinação de enzima com atividade de protease foi realizada segundo Germano et al. (2003). A enzima foi extraída da amostra, previamente preparada, com solução contendo NaCl 1%, em agitação constante a 28° C por 20

min. Após filtração e centrifugação, 0,25 mL do extrato de enzima obtido foi colocado em tubos de ensaio de 10 mL, contendo 0,5 mL de solução 0,5% albumina de soro bovino (ASB) e 0,25 mL de solução tampão fosfato 0,2 M pH 7,0. A mistura foi mantida sob agitação de 100 xg por 20 min a 50°C em incubadora Shaker. Após este período, foram adicionados 2,5 mL de TCA (ácido tricloroacético) 10% e 0,7 mL de NaOH 1N. As amostras foram centrifugadas por 20 min a 2500 xg e o sobrenadante obtido foi analisado por espectrofotometria a 440 nm. Uma unidade de atividade de protease (U) foi definida como a quantidade de enzima que produziu uma variação na medida de absorbância (em relação ao branco) nas condições da análise, para 20 min de incubação por 1 g de massa seca (gms) da amostra sólida ( $U = \text{abs}/\text{min.gms}$ ). Os resultados foram expressos em média da triplicata realizada.

#### Determinação de enzima com atividade de Lipase

A enzima com atividade de lipase foi extraída da amostra previamente preparada com tampão TRIS – HCl 5mM, pH 7,0, na proporção 1:5 (m/v). Após agitação em Shaker a 200 xg por 30 min, a amostra foi filtrada e centrifugada a 1600 xg por 5 min.

A determinação da atividade de lipase foi realizada segundo metodologia descrita por Winkler e Stukmann (1979), modificada por Lima (2004), que utiliza o palmitato de  $\rho$ -nitrofenila como substrato, em meio aquoso, e a goma arábica e o Triton X-100 como surfactante. A formação do  $\rho$ -nitrofenol ( $\rho$ -NP) foi quantificada em espectrofotômetro a 410 nm. Uma unidade de enzima com atividade de lipase foi definida como a liberação de 1  $\mu\text{mol}$  de  $\rho$ -NP por min. A atividade da enzima foi calculada a partir do coeficiente de absorvidade molar do  $\rho$ -NP, obtido a partir de uma curva padrão (0,002 – 0,2  $\mu\text{mol}/\text{mL}$ ) realizada nas condições do ensaio. Os resultados foram expressos em média da triplicata realizada. Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima

necessária para liberar 1  $\mu\text{mol}$  de  $\rho$ -NP/min nas condições de ensaio.

#### Determinação de enzima com atividade de Celulase

A enzima com atividade de celulase foi extraída de 1g de amostra de natto liofilizado com 17 mL de tampão fosfato de sódio, 50 mM pH 7,0. Após 30 min de agitação em Shaker a 250 xg a 35° C a amostra foi filtrada e centrifugada a 2000 xg por 20 min.

A determinação de atividade foi realizada pelo método do DNS (Miller, 1959), com 1,4 mL de extrato adicionados a 1,4 mL do reagente DNS, utilizando pedaços de papel filtro (1 x 12 cm) como substrato. Os tubos, contendo as amostras e o DNS, foram colocados um banho fervente por 5 min e, em seguida, resfriados em banho de gelo. A absorbância foi medida em espectrofotômetro (UV-Vis), em 540 nm. A curva padrão de glicose (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) foi construída nas mesmas condições da análise. Uma unidade de atividade celulásica (U) foi definida como a quantidade de  $\mu\text{mol}$  de açúcares redutores (AR) liberados por min/g de massa seca da amostra, nas as condições de ensaio ( $U = \mu\text{mol AR}/\text{min gms}$ ). Os resultados foram expressos em média da triplicata realizada.

## Resultados e Discussão

#### Otimização das condições de fermentação para produção do natto com elevado teor de isoflavonas agliconas

A matriz dos ensaios com valores reais das variáveis estudadas, bem como a resposta obtida estão apresentados na Tabela 1. Observa-se que no ensaio 1 obteve-se o maior teor ( $X_1 = 10^3$  UFC/mL;  $X_2 = 25^\circ \text{C}$ ;  $X_3 = 12 \text{ h}$ ) enquanto que o menor teor de isoflavonas agliconas foi obtido no ensaio 4 ( $X_1 = 10^3$  UFC/mL;  $X_2 = 45^\circ \text{C}$ ;  $X_3 = 36 \text{ h}$ ).

Os resultados da análise de variância (ANOVA) dos dados obtidos podem ser observados na Tabela 2. Os resultados foram significativos ( $p < 0,10$ ) para as variáveis independentes temperatura ( $X_2$ ), tempo de

fermentação ( $X_3$ ) e interação entre inóculo e tempo ( $X_1 \cdot X_3$ ). O controle de soja *in natura* apresentou 3,72 mg/100g de natto de isoflavonas agliconas e o controle de soja cozida não inoculada o teor de 39,02 mg/100g de natto de isoflavonas agliconas.

A interação entre as variáveis inóculo ( $X_1$ ) e tempo de fermentação ( $X_3$ ) apresentou efeito positivo na função resposta, ou seja, a elevação desse fator aumenta o teor de isoflavonas agliconas, enquanto que as variáveis temperatura (L) e tempo de incubação (L) tiveram um efeito negativo na função resposta. Assim, foi possível obter o modelo matemático preditivo com as variáveis codificadas das respostas significativas (Equação 1).

$$Y = 18,68535 - 4,83900x_2 - 6,08700x_3 + 3,70375x_{13}$$

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi igual a 0,83 indicando que 83% dos dados ajustaram-se ao modelo proposto. A falta de ajuste foi não significativa e, portanto, este modelo é útil para fins preditivos e foi possível construir os gráficos de superfície de resposta (Figuras 1- 3).

**Tabela 1:** Matriz dos ensaios do DCC com as variáveis independentes e resposta experimental para otimização na produção de natto com elevado teor de isoflavonas agliconas

Ensaio	Inóculo (UFC/mL)	Temperatura (°C)	Incubação (h)	Isoflavonas Agliconas (mg/100 g)
1	10 <sup>3</sup>	25	12	33,34
2	10 <sup>3</sup>	25	36	21,87
3	10 <sup>3</sup>	45	12	29,84
4	10 <sup>3</sup>	45	36	9,58
5	10 <sup>9</sup>	25	12	33,83
6	10 <sup>9</sup>	25	36	27,85
7	10 <sup>9</sup>	45	12	23,41
8	10 <sup>9</sup>	45	36	20,99
9	10 <sup>3</sup>	35	24	27,02
10	10 <sup>9</sup>	35	24	21,00
11	10 <sup>6</sup>	25	24	32,30
12	10 <sup>6</sup>	45	24	23,28
13	10 <sup>6</sup>	35	12	29,99
14	10 <sup>6</sup>	35	36	15,55
15*	10 <sup>6</sup>	35	24	17,05
16*	10 <sup>6</sup>	35	24	11,24
17*	10 <sup>6</sup>	35	24	13,83

\*Pontos centrais, UFC: Unidades formadoras de colônia

**Tabela 2:** Análise ANOVA da otimização da produção do natto com elevado teor de isoflavonas agliconas

Fonte de variação	Soma dos quadrados	Graus de Liberdade	Quadrados médios	Teste F	p*
Inóculo (L)	0,076	1	0,0757	0,00279	0,959361
Inóculo (Q)	9,077	1	9,0771	0,33443	0,581184
Temperatura (L)	234,159	1	234,1592	8,62708	0,021800
Temperatura (Q)	84,641	1	84,6414	3,11843	0,120756
tempo (L)	370,516	1	370,5157	13,65084	0,007709
tempo (Q)	0,967	1	0,9666	0,03561	0,855675
Inóculo x T	2,892	1	2,8920	0,10655	0,753649
Inóculo x tempo	109,742	1	109,7421	4,04321	0,084270
Temperatura x t	0,143	1	0,1431	0,00527	0,944145
Erro	189,996	7	27,1423		
Total	1115,840	16			
R <sup>2</sup>		0,83			

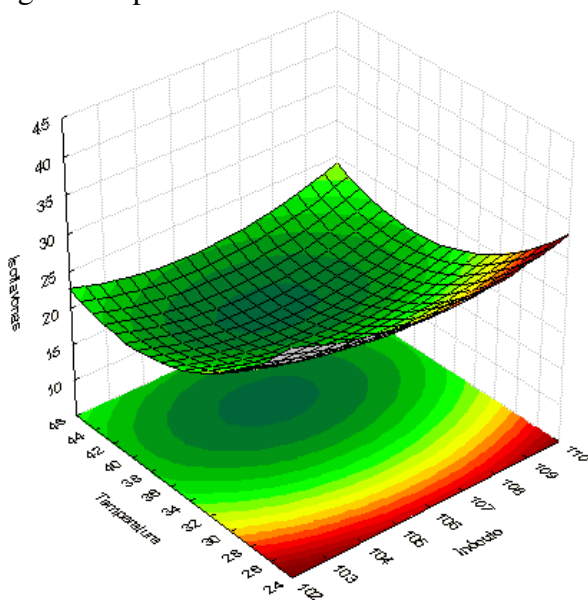
\*p < 0,10 são considerados significativos, L: linear; Q: quadrado.

Analisando a interação entre as variáveis  $X_1$  (inóculo) e  $X_2$  (temperatura) na superfície de resposta (Figura 1) observa-se maior teor de isoflavonas agliconas em baixas temperaturas de fermentação em concentração do inóculo de  $10^2$  a  $10^{10}$  UFC/mL, indicando baixa influência deste em temperaturas brandas.

Wu e Chou (2009) observaram um aumento do teor de isoflavonas de 67,4  $\mu\text{g/g}$  para 110,75  $\mu\text{g/g}$  em base seca, na produção de natto de soja preta quando a temperatura foi elevada de 35° C para 50° C. Estes resultados indicam a influência da temperatura de fermentação no teor de isoflavonas agliconas.

A interação entre as variáveis  $X_1$  (inóculo) e  $X_3$  (tempo de fermentação) pode ser observada na Figura 2. Encontram-se maiores valores de isoflavonas agliconas na região de  $10^2$  a  $10^4$  UFC/mL com 10 a 14 h de fermentação, com um aumento de 10 vezes em relação à soja *in natura* (controle 1).

**Figura 1:** Superfície de resposta para efeito da concentração de inóculo (UFC/mL) e temperatura (° C) no teor de isoflavonas agliconas presente no natto

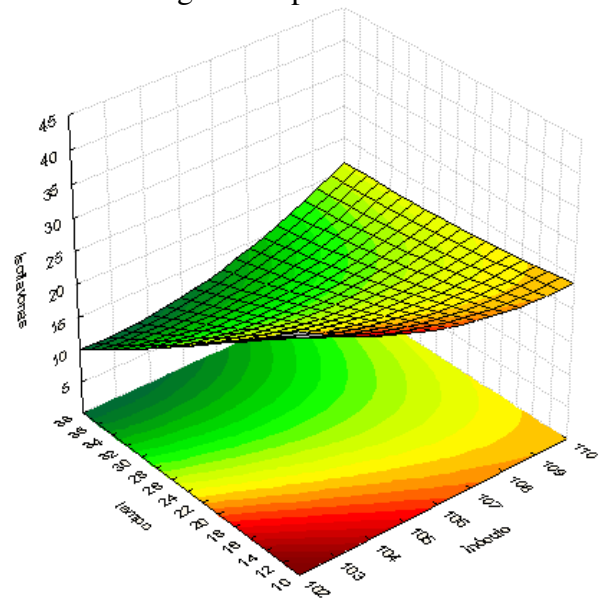


Hu e colaboradores (2010) relataram um aumento de 54% e 13% de daidzeína e genisteína, respectivamente, no teor de isoflavonas totais no natto de soja preta após 48 h de fermentação, sendo este o maior

tempo testado por eles. Esse aumento frente ao maior tempo de incubação difere da diminuição encontrada neste trabalho possivelmente pela diferente cultivar de soja utilizada, uma vez que se sabe que o teor de isoflavonas em grãos de soja é influenciado por fatores genéticos, ano de cultura e local de crescimento (PARK et al., 2001).

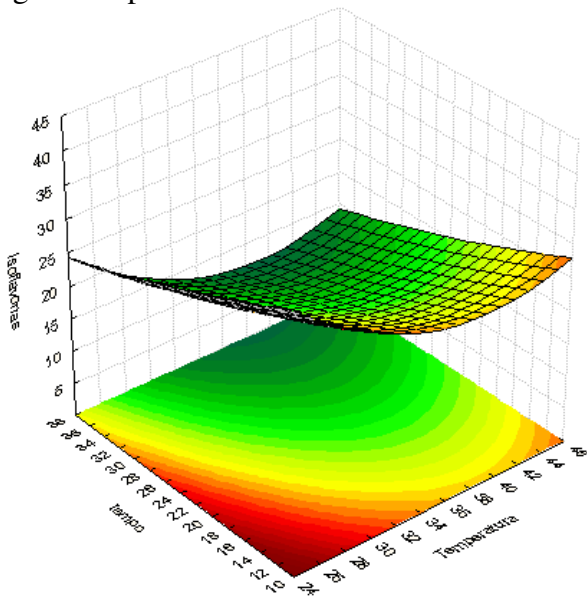
O trabalho de Toda e colaboradores (1999) descreve a ocorrência de uma interconversão enzimática dos conjugados glicosídeos no correspondente 6"-O-succinil glicosídeo, justificando a diminuição do teor da forma aglicona que é inicialmente acumulada e depois sofre uma queda. Esse metabólito de isoflavona é estudado no trabalho de Park e colaboradores (2010) que relatam sua formação em alimentos a base de soja fermentados com espécies de *Bacillus*, como o *cheonggukjang* e natto. Esta via de conversão pode justificar a diminuição do teor de isoflavonas agliconas com o aumento do tempo de fermentação

**Figura 2:** Superfície de resposta para efeito da concentração de inóculo (UFC/mL) e tempo de fermentação (h) no teor de isoflavonas agliconas presente no natto



Analisando a interação entre as variáveis  $X_2$  (temperatura) e  $X_3$  (tempo de fermentação) na superfície de resposta (Figura 3) observa-se novamente uma área de maiores valores para temperaturas de 24 a 26° C e 10 a 14h.

**Figura 3:** Superfície de resposta para efeito da temperatura ( $^{\circ}$  C) e do tempo de fermentação (h) no teor de isoflavonas agliconas presente no natto

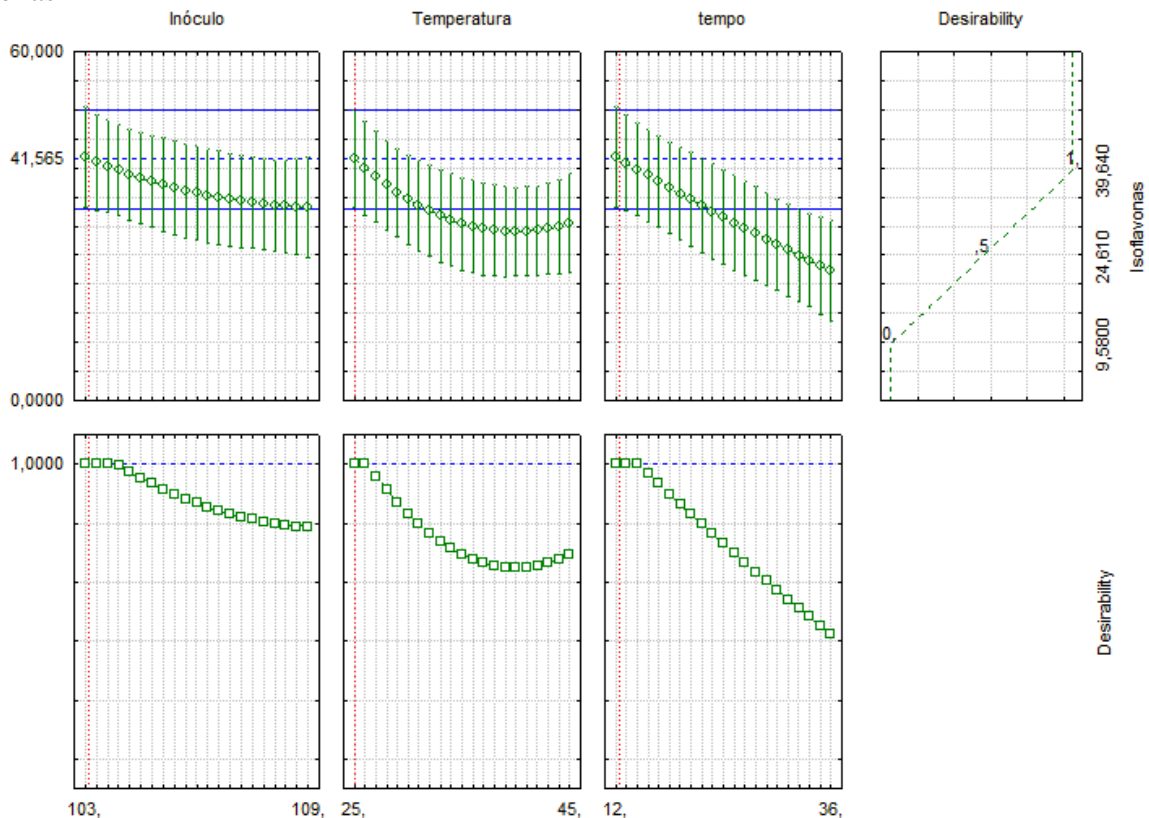


Huang e colaboradores (2011) testaram o efeito destas variáveis no teor de isoflavonas do *sufu*, um produto fermentado de soja muito apreciado na China. O controle não

fermentado apresentou maior teor de isoflavonas totais do que o produto fermentado e foi observada uma elevação do teor de agliconas de 168,13 para 294,96  $\mu$ g/g base seca, com o aumento da temperatura de 25 para 45 $^{\circ}$  C e com o tempo de fermentação de 4 a 16 dias. Diferentemente deste trabalho onde foi obtido um aumento de 3,72 mg/100g do controle *in natura* para 33,34 mg/100g do ensaio 1 com o menor nível de temperatura estudado, 25 $^{\circ}$  C, e tempo de fermentação, 24 h.

O gráfico do Perfil dos Valores Preditos e Desejabilidade para a produção do natto (Figura 4) auxilia na determinação das melhores condições de preparo variando os 3 fatores: inóculo (UFC/mL), temperatura ( $^{\circ}$  C) e tempo (h) na busca de uma alimento com alto teor de isoflavonas agliconas (desejabilidade 1). Os efeitos dos fatores sobre o teor de isoflavonas agliconas convergiram. Os maiores valores da variável resposta são obtidos com  $10^3$  UFC/mL, 25 $^{\circ}$  C e 12 h.

**Figura 4:** Gráfico do perfil desejável para a produção de natto com elevado teor de isoflavonas agliconas



Por meio dos gráficos do Perfil dos Valores Preditos e Desejabilidade, da análise estatística, foi possível determinar pontos ótimos para a produção de um natto com elevado teor de isoflavonas agliconas.

Foi produzido o natto, em triplicata, nas condições de  $10^3$  UFC/mL e fermentado à 25° C por 12 h de fermentação para validação do modelo matemático proposto.

Análise da composição centesimal do natto em pó produzido em condições otimizadas

Os resultados da análise de composição centesimal do natto em pó obtido nas condições otimizadas (Y) e dos controles de grão *in natura* (C1) e grão cozido não inoculado (C2) estão dispostos na tabela 3.

Observa-se um aumento de 12,80 para 64,20 % de umidade em relação ao grão (C1).

Proteínas, lipídeos e cinzas reduziram em 47,8%, 50% e 29%. O teor de açúcares totais reduziram em 51%.

Estes resultados foram semelhantes aos reportados por Shanmugasundaram e colaboradores (1991), que encontraram no Natto 59% de umidade, 16,5% de proteína, 10 % de lipídeo e 1,9% de cinzas e com o descrito por OHTA (1986): 59,5% de umidade, 16,5% de proteína e 10% de lipídeo.

Omafuvbe e colaboradores (2000) pesquisaram *soy-daddawa*, produto fermentado de soja similar ao natto e o teor de umidade encontrado após fermentação por 12 h foi de  $61,20 \pm 0,18\%$ , próximo ao observado neste trabalho. Porém a proporção de açúcares totais foi de  $20,56 \pm 0,30\%$  sendo um produto mais doce.

**Tabela 3:** Composição centesimal do natto produzido em condições otimizadas

Amostra	Umidade (%)	Açúcares Totais (µg/g)	Proteína* (%)	Lipídeos* (%)	Cinzas* (%)	Carboidratos Totais** (%)
Y	$64,20 \pm 0,34^b$	$11,30 \pm 0,64^c$	$18,95 \pm 0,82^c$	$11,78 \pm 0,23^d$	$1,43 \pm 0,31^b$	$67,84 \pm 0,70^d$
C1	$12,80^a$	$21,99^a$	$39,64^b$	$23,60^b$	$4,94^a$	$31,82^b$
C2	$62,99^c$	$21,12^b$	$43,21^a$	$27,84^a$	$4,61^a$	$24,35^c$

Y: natto em pó obtido em condições otimizadas. C1: controle soja in natura. C2: controle soja cozida não inoculada.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (Tukey  $p < 0,10$ )

Média da triplicata dos nattos produzidos  $\pm$  desvio padrão. \* em base seca. \*\* calculado pela diferença.

Análise de enzima do natto em pó produzido em condições otimizadas

Foi determinado em triplicata a atividade das enzimas protease, lipase e celulase, do natto em pó Y e dos controles de grão *in*

*natura* (C1) e grão cozido não inoculado (C2) (Tabela 4).

A atividade de protease foi inferior que à observada em outros trabalhos com produtos similares (OMAFUVBE et al., 2000; INATSU et al., 2006).

**Tabela 4:** Análise de enzimas do natto em pó produzido em condições

Amostra	Protease (U/g)	Lipase (U/g)	Celulase (U/g)
Y	$0,1381 \pm 0,005^a$	$13,058 \pm 0,29^b$	$0,4353 \pm 0,024^b$
C1	$0,0561 \pm 0,016^b$	$7,9804 \pm 1,26^d$	$0,3723 \pm 0,003^c$
C2	$0,0469 \pm 0,035^b$	$0,00^c$	$0,1348 \pm 0,048^d$

Y: natto em pó obtido em condições otimizadas. C1: controle soja in natura.

C2: controle soja cozida não inoculada.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (Tukey  $p < 0,10$ )

Média da triplicata da análises

Os valores encontrados para a atividade de lipase condizem com outros estudos com produtos fermentados de soja análogos ao natto, e de uma maneira geral são considerados pequenos. Omafuvbe e colaboradores (2000) observaram o valor de  $1,17 \pm 0,17$  U/mL para 24 h de fermentação no *soy-daddawa*. Chukeatirote e colaboradores (2006) por sua vez obtiveram 1,10 U/mL no *Thua nao* para o mesmo tempo de incubação.

A atividade das enzimas estudadas aumentou com o processo fermentativo, quando comparado aos controles não inoculados, indicando a produção destas pela bactéria utilizada.

A presença de enzimas com atividade de protease, lipase e celulase no produto se mostra interessante por sua função de hidrólise de compostos presentes na soja, aumentando sua digestibilidade.

## Conclusão

Por meio das análises da metodologia de superfície de resposta foram selecionadas as melhores condições de preparo do natto para obtenção do maior valor de isoflavonas agliconas de 33,34 mg/100g, encontrado com  $10^3$  UFC/mL, 25° C e 12 h de incubação. Nestas condições foi possível desenvolver e caracterizar um produto enriquecido, com forte potencial funcional.

## Agradecimentos

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Profa. Dra Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi pela doação da cepa de *Bacillus subtilis* Natto para a execução deste trabalho.

## Referências

COWARD, L. BARNES, N. C.; SETCHELL, K. D. R.; BARNES, S. Genistein, Daidzein and their  $\beta$ -glycoside conjugates: antitumor isoflavonas in soybean foods from American and Asian diets. **Journal of Agricultural Foods and Chemistry**, v 41, p. 1961 – 1967, 1993.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350–356, 1956.

ERNANDES, F. M. P. G. Utilização de diferentes substratos para a produção de etanol, levana e sorbitol por *Zymomonas mobilis*. Tese para obtenção do Título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 167 p., 2009.

GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C. R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 246–251, 2003.

HU, Y.; GE, C.; YUAN, W.; ZHU, R.; ZHANG, W.; DUC, L. E XUEB, J. Characterization of fermented black soybean natto inoculated with *Bacillus natto* during fermentation. **Journal of Science Food and Agricultural**, v 90, p 1194–1202, 2010.

HUANG, Y.; LAI, Y. and CHOU, C. Fermentation temperature affects the antioxidant activity of the enzyme-ripened sufu, an oriental traditional fermented product of soybean. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v 112, n 1, p. 49–53, 2011.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, p. 21-22. 1985.

KAWAMOTO, S. Characterization of *Bacillus subtilis* strains in Thua nao, a traditional fermented soybean food in northern Thailand. **Journal compilation, The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology**, v 43, p 237–242, 2006.

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N., MITCHELL, D.A.; BARATTI, J.C., FILLIPPIS, I.; FONTANA, J.D. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 31, p. 53–61, 2004 .

MUROOKA, Y. E YAMSHITA, M. **Traditional healthful fermented products of Japan. J Ind Microbiol Biotechnol**, v 35, p 791–798, 2008.

OHTA T. Natto. Capítulo 5 em *Legume-based Fermented Foods* NR Reddy MD Pierson. D Merle, DK Salunkhe, CRC Press. p. 85-93, 1986.

OMAFUVBE, B. O.; SHONUKAN, O. O.; ABIOSE S. H. Microbiological and biochemical changes in the traditional fermentation of soybean for ‘soy-daddawa’ – Nigerian food condiment. **Food Microbiology**, no 17, p. 469-474, 2000.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; NERY, I. A.; AGUIAR, C. L. AND PACHECO, T. A. R. C.. **Enrichment of Isoflavone Aglycones in Extracted**

**Soybean Isoflavones by Heat and Fungal  $\beta$ -Glucosidase.** Department of Food Science, College of Food Engineering, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil. v. 34, no 4, ISSN 0257 – 2397, p. 14 – 19, 2001.

RAGHUVANSHI, R.S.; SINGH, D.P. Preparation and use. In: Erskine, W., Muehlbauer F.J., Sarker A. and Sharma, B. *The Lentil: Botany, Production and Uses.* CAB International, Wallingford, UK, p. 408–424, 2009.

SILVA, M. S.; NAVES, M. M. V.; OLIVEIRA, R. B.; LEITE, O. S. M. Composição Química e Valor proteico do resíduo de soja em relação ao Grão de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v 26, n 3, p. 571-576, 2006.

SHANMUGASUNDARAM, S., S.-T. CHENG, M.-T. HUANG; M.-R. YAN. Varietal Improvement of Vegetable Soybean in Taiwan, in **Vegetable Soybean: Research Needs for Production and Quality Improvement**, edited by S. Shanmugasundaram, Asian Vegetable Research and Development Center, p. 30 – 42, 1991.

STEINKRAUS, K. H. Indigenous fermented amino acid/peptide sauces and pastes with meatlike flavors: Chinese soy sauce Japanese shoyu Japanese miso southeast Asian fish sauces and pastes and related foods, seção 5 in *Handbook of Indigenous Fermented Foods Microbiology series*, v. 9 p. 530–547, 1983.

STEINKRAUS, K.H. Fermentations in World Food Processing. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v 1, p. 23 - 32, 2002.

TODA, T.; UESUGI, T.; HIRAI, K.; NUKAYA, H.; TSUJI, K.; ISHIDA, H. New 6-O-acyl isoflavone glycosides from soybeans fermented with *Bacillus subtilis* (natto). I. 6-O-succinylated isoflavone glycosides and their preventive effects on bone loss in ovariectomized rats fed a calcium-deficient diet. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, n 22, v11, p.1193-1201, 1999.

VILLARES, A.; ROSTAGNO, M. A.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; MARTÍNEZ, J. A. Content and Profile of Isoflavones in Soy-Based Foods as a Function of the Production Process. **Food Bioprocess Technology**, n 4, p. 27–38, 2011.

WEI, Q.; HALL, W.; CHANG, K.C. Natto characteristics as affected by steaming time, *Bacillus subtilis* strain, and fermentation time. **Journal of food science**, v 66, n 1, p. 167-173, 2001.

WU, C. and CHOU, C. Enhancement of Aglycone, Vitamin K2 and Superoxide Dismutase Activity of Black Soybean through Fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC 14715 at Different Temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v 57, n 22, p. 10695–10700, 2009.

YOSHIARA L. Y.; MADEIRA T. B.; DELAROZA F.; SILVA J. B.; IDA E. I. Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex-centroid mixture design. *Int. Journal of Food Science and Nutrition* 2012. In Press. DOI: 10.3109/09637486.2012.690026, 2012.

### **5.3 ARTIGO CIENTÍFICO 3**

Título: Otimização da Produção de Natto em Pó com Elevada Atividade Antioxidante, International Journal of Food Microbiology.

# Otimização da Produção de Natto em Pó com Elevada Atividade Antioxidante

R. F. C. Badini, et al.

Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rod. Celso Garcia Cid, Km 380, CP 6001 – 95070-560 Londrina – PR, Brasil.

---

## Resumo

O natto é um preparado de soja obtido por fermentação dos grãos com a bactéria *Bacillus subtilis* Natto. Apresenta sensação de adstringência e um odor característico assim como uma textura viscosa que recobre os grãos. O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito de diferentes quantidades de inóculo, temperaturas e do tempos de fermentação na elaboração de natto em pó por fermentação de grãos de soja com *B. subtilis* Natto utilizando um Delineamento Composto Central (2<sup>3</sup>) tendo como função resposta a atividade antioxidante, com variação do inóculo de 10<sup>3</sup> – 10<sup>9</sup> UFC/mL, da temperatura de 25 – 45° C e do tempo de fermentação de 12 – 36 h. A condição que resultou no natto com a maior atividade antioxidante (1,23 µM de Trolox/g) foi de inóculo de 10<sup>9</sup> UFC/mL, 45° C e 36 h de incubação. O natto em pó produzido nestas condições ótimas apresentou 62,45% de umidade, 9,29 µg/g de açúcares totais, 17,54% de proteínas, 10,48% de lipídeos, 4,57% de cinzas e 67,40% de carboidratos totais. Também foi determinada enzimas com atividade de protease (0,16 U/g), de lipase (14,53 U/g) e de celulase (0,32 U/g) no natto otimizado.

*Palavras chave:* Natto; Fermentação; Soja; atividade antioxidante

---

## 1. Introdução

O homem tem consumido alimentos fermentados há mais de 10 mil anos, sendo a fermentação a forma mais antiga da biotecnologia alimentar.

A soja destaca-se para produção de alimentos fermentados por resultar em produtos nutritivos, com alto teor de proteínas, vitaminas, minerais, carboidratos e fibras, e apresentarem uma correlação positiva entre o seu consumo e diversos benefícios à saúde (SILVA et al., 2006).

Pesquisas têm relatado a existência de atividade antioxidante na soja, cuja ingestão pode reduzir os danos oxidativos induzidos por radicais livres, exercendo assim um benefício à saúde. Além disso, descobriu-se que os produtos fermentados de soja, incluindo os produtos orientais tradicionais, tais como natto, missô, *tempeh*, apresentam uma atividade

antioxidante mais elevada do que a soja *in natura* (INATSU et al., 2006; HUANG, 2011).

O natto é um alimento obtido pela fermentação de grãos de soja pela bactéria *B. subtilis* Natto.

O objetivo desta pesquisa foi produzir um natto em pó, com composição química definida, após avaliar as melhores condições de fermentação da soja com *B. subtilis* Natto, para a obtenção de elevado teor de atividade antioxidante.

## 2. Materiais e métodos

### 2.1. Matéria-Prima

Foram utilizados grãos de soja da cultivar BRS 216, desenvolvida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Soja) – Londrina/PR, Brasil, para a produção do natto. Os grãos foram submetidos à uma seleção prévia para eliminação de danificados.

A cepa utilizada de *B. subtilis* Natto (CCT 7712) foi isolada no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina PR, Brasil, identificada pela Fundação André Tosello, São Paulo, SP, Brasil.

## 2.2. Preparo do inóculo

A metodologia empregada para o preparo do inóculo de *B. subtilis* Natto foi descrita por Hu e colaboradores (2010). A *B. subtilis* Natto foi preservada em meio de cultivo contendo (g/L): peptona, 50; extrato de carne, 30; e ágar, 60, incubado a 37° C por 48 h e estocado a 4° C. A cepa em ágar inclinado foi transferida e cultivada em 10 mL de caldo nutriente (NB) composto por peptona, 5 g/L, e extrato de carne, 3 g/L. Após 48 h a 37° C, o cultivo foi centrifugado a 5000 xg por 10 min e o pellet de células ressuspenso em 5 mL de água estéril contendo 8,5 g/L de NaCl, pH 7 e, posteriormente, diluído até a população viável necessária, conforme experimentos.

A contagem das unidades formadoras (UFC) de colônias da bactéria foi realizada em microscópio, utilizando Câmara de Neubauer, e associada a diluições do meio de cultivo líquido por meio de uma curva de turbidimetria, segundo Ernandes (2009).

## 2.3. Preparo da soja

Os grãos de soja foram lavados, embebidos em água à temperatura ambiente (28° C) por aproximadamente 14 h, até o dobro do peso inicial e, em seguida, drenados. Os grãos hidratados foram cozidos no vapor a 121° C (1kg/cm<sup>2</sup>) por 20 min em autoclave. O tempo de cozimento foi determinado após teste preliminar de dureza comparando-se com o natto comercial. Os grãos cozidos foram imediatamente cobertos com uma folha de alumínio, resfriados até 28° C e pesados (WEI et al., 2001).

## 2.4. Produção do natto

A fermentação dos grãos de soja com *B. subtilis* Natto foi realizada segundo Wu e Chou (2009). 5 mL do inóculo foram adicionados a 100 g da soja cozida, misturados cuidadosamente e cobertos com filme plástico

perfurado na parte superior. A soja inoculada foi fermentada em Shaker a 25, 35 e 45° C por 12, 24 e 36 horas.

## 2.5. Delineamento experimental e análises estatísticas

Para determinação das condições ótimas de produção do natto com elevado teor de isoflavonas agliconas foi realizado um planejamento experimental com esquema fatorial 2<sup>3</sup>, com três repetições do ponto central, e três níveis totalizando 17 ensaios (Tabela 1).

Foi avaliada a influência das variáveis independentes X<sub>1</sub> = inóculo (UFC/mL), X<sub>2</sub> = temperatura (° C) e X<sub>3</sub> = tempo de fermentação (h) na atividade antioxidante (µM de Trolox/g).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 10% e plotados os mapas de superfície de resposta utilizando-se o programa STATISTICA 7.0 da StatSoft, Inc, Tulsa, OK, USA (2004).

Foi produzido um natto na melhor condição de preparo para obtenção de elevada atividade antioxidante. O natto obtido foi homogeneizado, liofilizado, moído e congelado até o momento da análise.

## 2.6. Determinação da composição centesimal

O teor de proteínas totais foi determinado pelo método de Kjeldahl, descrito pela AOAC (1975), utilizando o fator de conversão 6,25.

O teor de umidade (estufa a 105° C), cinzas (mufla a 550° C) e lipídeos (extrato soxhlet) foram quantificados segundo metodologias descritas pelo Instituto Adolf Lutz (1985).

O teor de carboidratos totais foi determinado pela diferença em relação às proteínas totais, lipídeos, umidade e cinzas. Os resultados foram expressos em porcentagem (%).

## 2.7. Determinação de açúcares totais

Os açúcares totais foram determinados pelo método fenol-sulfúrico segundo Dubois et al. (1956), utilizando solução padrão de D-glucose.

## 2.8. Determinação da atividade antioxidante

Para determinação da atividade antioxidante foram extraídos os compostos fenólicos das amostras de natto previamente liofilizadas, moídas e desengorduradas com etanol 80% na proporção 1:10 (m/v). Para a determinação da capacidade antioxidante foi misturado 1,0 mL de tampão acetato 0,1 M, pH 5,5; 1,0 mL de etanol absoluto, 0,5 mL do radical DPPH 250  $\mu\text{mol/L}$  e 50,0  $\mu\text{L}$  de amostra. As misturas foram mantidas em repouso no escuro por 30 min a temperatura ambiente e, posteriormente, realizado a leitura da absorvância a 517 nm. A quantificação da atividade antioxidante dos extratos foi realizada por meio de uma curva padrão de Trolox (1 – 50  $\mu\text{mol/L}$ ).

### 2.9. Determinação da atividade de Protease

A determinação de enzima com atividade de protease foi realizada segundo Germano et al. (2003). A enzima foi extraída da amostra, previamente preparada, com solução contendo NaCl 1%, em agitação constante a 28° C por 20 min. Após filtração e centrifugação, 0,25 mL do extrato de enzima obtido foi colocado em tubos de ensaio de 10 mL, contendo 0,5 mL de solução 0,5% albumina de soro bovino (ASB) e 0,25 mL de solução tampão fosfato 0,2 M pH 7,0. A mistura foi mantida sob agitação de 100 xg por 20 min a 50°C em incubadora Shaker. Após este período, foram adicionados 2,5 mL de TCA (ácido tricloroacético) 10% e 0,7 mL de NaOH 1N. As amostras foram centrifugadas por 20 min a 2500 xg e o sobrenadante obtido foi analisado por espectrofotometria a 440 nm. Uma unidade de atividade de protease (U) foi definida como a quantidade de enzima que produziu uma variação na medida de absorvância (em relação ao branco) nas condições da análise, para 20 min de incubação por 1 g de massa seca (gms) da amostra sólida ( $U = \text{Abs}/\text{min gms}$ ). Os resultados foram expressos em média da triplicata realizada.

### 2.10. Determinação da atividade de Lipase

A enzima com atividade de lipase foi extraída da amostra previamente preparada com tampão TRIS – HCl 5mM, pH 7,0, na proporção 1:5 (m/v). Após agitação em Shaker a 200 xg por 30 min, a amostra foi filtrada e centrifugada a 1600 xg por 5 min.

A determinação da atividade de lipase foi realizada segundo metodologia descrita por Winkler e Stukmann (1979), modificada por Lima (2004), que utiliza o palmitato de  $p$ -nitrofenila como substrato, em meio aquoso, e a goma arábica e o Triton X-100 como surfactante. A formação do  $p$ -nitrofenol ( $p$ -NP) foi quantificada em espectrofotômetro a 410 nm. Uma unidade de enzima com atividade de lipase foi definida como a liberação de 1  $\mu\text{mol}$  de  $p$ -NP por min. A atividade da enzima foi calculada a partir do coeficiente de absorvância molar do  $p$ -NP, obtido a partir de uma curva padrão (0,002 – 0,2  $\mu\text{mol/mL}$ ) realizada nas condições do ensaio. Os resultados foram expressos em média da triplicata realizada.

### 2.11. Determinação da atividade de Celulase

A enzima com atividade de celulase foi extraída de 1g de amostra de natto liofilizado com 17 mL de tampão fosfato de sódio, 50 mM pH 7,0. Após 30 min de agitação em Shaker a 250 xg a 35° C a amostra foi filtrada e centrifugada a 2000 xg por 20 min.

A determinação de atividade foi realizada pelo método do DNS (Miller, 1959), com 1,4mL de extrato adicionados a 1,4 mL do reagente DNS, utilizando pedaços de papel filtro (1 x 12 cm) como substrato. Os tubos, contendo as amostras e o DNS, foram colocados um banho fervente por 5 min e, em seguida, resfriados em banho de gelo. A absorvância foi medida em espectrofotômetro (UV-Vis), em 540 nm. A curva padrão de glicose (100  $\mu\text{g/mL}$ ) foi construída nas mesmas condições da análise. Uma unidade de atividade celulásica (U) foi definida como a quantidade de  $\mu\text{mol}$  de açúcares redutores (AR) liberados por min/g de massa seca da amostra, nas as condições de ensaio ( $U = \mu\text{mol AR}/\text{min gms}$ ). Os resultados foram expressos em média da triplicata realizada.

## 3. Resultados

### 3.1. Otimização das condições de fermentação para produção do natto com elevada atividade antioxidante

A matriz dos ensaios com valores reais e a resposta obtida e estimada estão apresentados e codificados das variáveis estudadas, bem como na Tabela 1.

**Tabela 1:** Matriz dos ensaios DCC com as variáveis independentes e resposta experimental para otimização na produção de natto com elevada atividade antioxidante

Ensaio	Inóculo (UFC/mL)		Temperatura (°C)		Incubação (h)		Atividade Antioxidante ( $\mu$ M Trolox/g b.s.)
	X <sub>1</sub> **	X <sub>1</sub> ***	X <sub>2</sub> **	X <sub>2</sub> ***	X <sub>3</sub> **	X <sub>3</sub> ***	
1	-1	10 <sup>3</sup>	-1	25	-1	12	0,98018
2	-1	10 <sup>3</sup>	-1	25	1	36	0,79109
3	-1	10 <sup>3</sup>	1	45	-1	12	0,93655
4	-1	10 <sup>3</sup>	1	45	1	36	0,68018
5	1	10 <sup>9</sup>	-1	25	-1	12	0,96745
6	1	10 <sup>9</sup>	-1	25	1	36	0,63291
7	1	10 <sup>9</sup>	1	45	-1	12	1,19291
8	1	10 <sup>9</sup>	1	45	1	36	1,22745
9	-1	10 <sup>3</sup>	0	35	0	24	0,62927
10	1	10 <sup>9</sup>	0	35	0	24	0,69655
11	0	10 <sup>6</sup>	-1	25	0	24	1,04200
12	0	10 <sup>6</sup>	1	45	0	24	0,82018
13	0	10 <sup>6</sup>	0	35	-1	12	0,81473
14	0	10 <sup>6</sup>	0	35	1	36	0,50018
15*	0	10 <sup>6</sup>	0	35	0	24	1,00
16*	0	10 <sup>6</sup>	0	35	0	24	0,96018
17*	0	10 <sup>6</sup>	0	35	0	24	0,83836

\*Pontos centrais \*\* Valores codificados \*\*\* Valores reais

**Tabela 2:** Análise ANOVA da otimização da produção do natto com elevada atividade antioxidante

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de Liberdade	Média quadrática	Teste F	p*
Inóculo (L)	0,049000	1	0,049000	1,658388	0,238757
Inóculo (Q)	0,008659	1	0,008659	0,293059	0,605060
Temperatura (L)	0,019682	1	0,019682	0,666119	0,441293
Temperatura (Q)	0,119657	1	0,119657	4,049741	0,084068
tempo (L)	0,112362	1	0,112362	3,802858	0,092155
tempo (Q)	0,010400	1	0,010400	0,351998	0,571647
Inóculo x T	0,118716	1	0,118716	4,017904	0,085057
Inóculo x tempo	0,002645	1	0,002645	0,089513	0,773484
Temperatura x t	0,011385	1	0,011385	0,385335	0,554427
Erro	0,206827	7	0,029547		
Total	0,642159	16			
R <sup>2</sup>			0,68		

\*p < 0,10 são considerados significativos

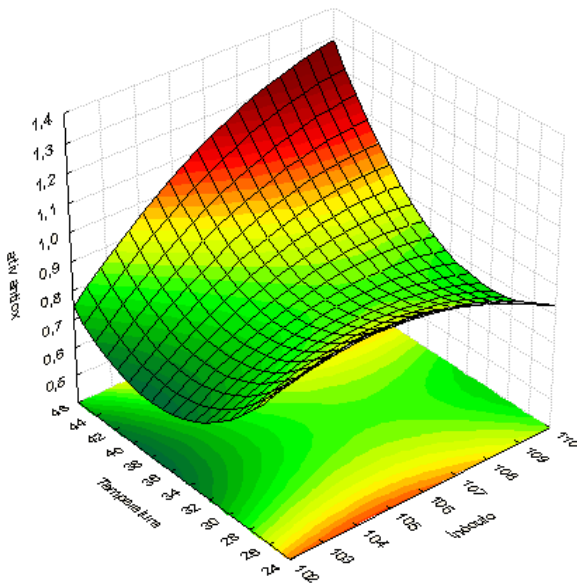
Os resultados da análise de variância (ANOVA) dos dados obtidos podem ser observados na Tabela 2. Nesta tabela observa-se que no ensaio 8 obteve-se a maior atividade ( $X_1 = 10^9$  UFC/mL;  $X_2 = 45^\circ$  C;  $X_3 = 36$  h) enquanto a menor atividade antioxidante foi obtida no ensaio 14 ( $X_1 = 10^6$  UFC/mL;  $X_2 = 35^\circ$  C;  $X_3 = 36$  h).

Assim, foi possível obter o modelo matemático preditivo com as variáveis codificadas das respostas significativas (Equação 1).

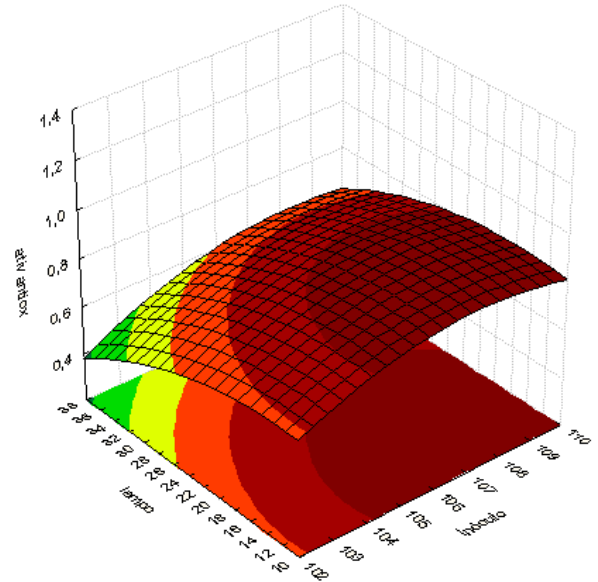
$$Y = 0,81108 + 0,21133x_2^2 - 0,10600x_3 + 0,12181x_{12}$$

A partir do modelo polinomial proposto (Equação 1) foi possível construir as superfícies de resposta (Figuras 1, 2 e 3) que possibilitaram uma melhor visualização da resposta, considerando as variáveis e suas interações.

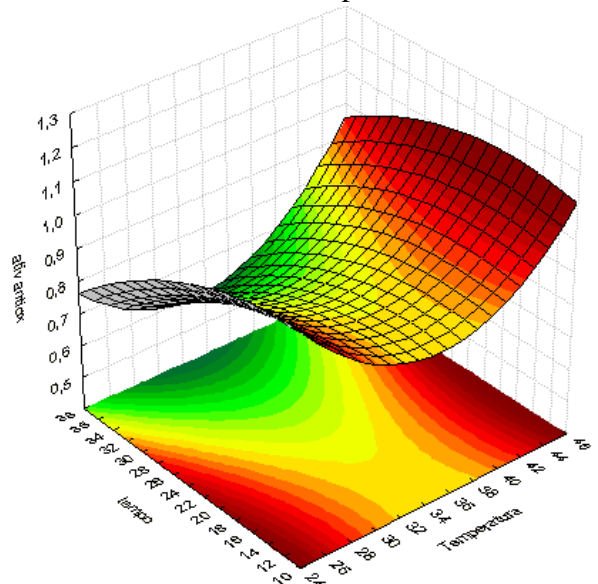
**Figura 1:** Superfície de resposta para efeito da concentração de inóculo (UFC/mL) e temperatura ( $^\circ$  C) na atividade antioxidante presente no natto



**Figura 2:** Superfície de resposta para efeito da concentração de inóculo (UFC/mL) e tempo (h) na atividade antioxidante presente no natto

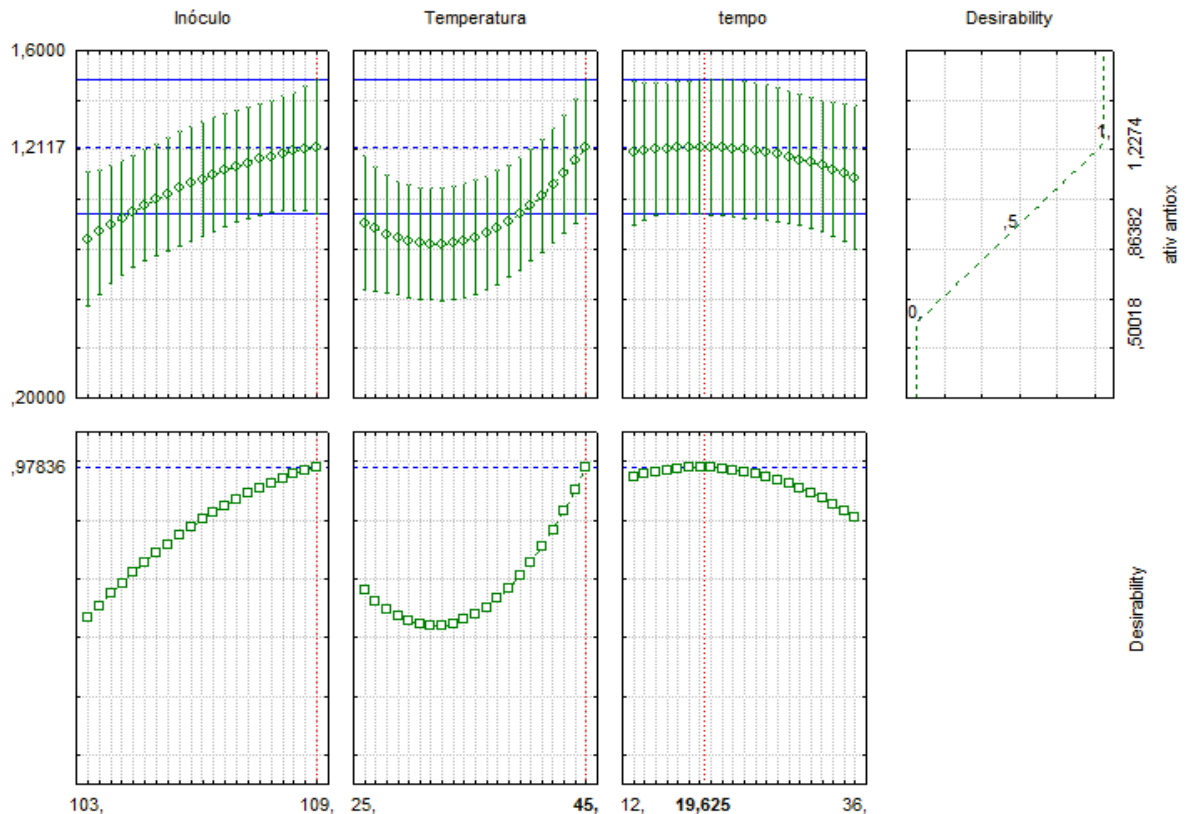


**Figura 3:** Superfície de resposta para efeito da temperatura ( $^\circ$  C) e do tempo (h) na atividade antioxidante presente no natto



O gráfico do Perfil dos Valores Preditos e Desejabilidade para a produção do natto (Figura 4) auxilia na determinação das melhores condições de preparo variando os 3 fatores inóculo (UFC/mL), temperatura ( $^\circ$  C) e tempo (h) na busca de um alimento com alta atividade antioxidante (desejabilidade 1).

**Figura 4:** Gráfico do perfil desejável para a produção de natto com elevada atividade antioxidante



### 3.2. Análise da composição centesimal do natto em pó produzido em condições otimizadas

Um natto com elevada atividade antioxidante (X) foi preparado em triplicata com inóculo de  $10^9$  UFC/mL e fermentado por 20 h à 45° C.

Os resultados da análise de composição centesimal do natto em pó X e dos controles de grão *in natura* (C1) e grão cozido não inoculado (C2) estão dispostos na tabela 3.

**Tabela 3:** Composição centesimal dos Nattos produzidos em condições otimizadas

Amostra	Umidade (%)	Açúcares Totais (µg/g)	Proteína* (%)	Lipídeos* (%)	Cinzas* (%)	Carboidratos Totais** (%)
X	62,45 ±0,98 <sup>b</sup>	9,29 ±0,24 <sup>d</sup>	17,54 ±0,56 <sup>d</sup>	10,48 ±0,41 <sup>c</sup>	4,57 ±0,63 <sup>a</sup>	67,40 ±0,93 <sup>d</sup>
C1	12,80 <sup>a</sup>	21,99 <sup>a</sup>	39,64 <sup>b</sup>	23,60 <sup>b</sup>	4,94 <sup>a</sup>	31,82 <sup>b</sup>
C2	62,99 <sup>c</sup>	21,12 <sup>b</sup>	43,21 <sup>a</sup>	27,84 <sup>a</sup>	4,61 <sup>a</sup>	24,35 <sup>c</sup>

X: natto em pó obtido em condições otimizadas. C1: controle soja *in natura*. C2: controle soja cozida não inoculada.

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (Tukey  $p < 0,10$ )

Média da triplicata dos nattos produzidos ± desvio padrão. \* em base seca. \*\* calculado pela diferença.

### 3.3. Análise enzimática do natto em pó produzido em condições otimizadas

Foi determinado em triplicata a atividade das enzimas protease, lipase e celulase, do natto em pó X e dos controles de grão *in natura* (C1) e grão cozido não inoculado (C2) (Tabela 4).

**Tabela 4:** Análise enzimática do natto em pó produzido em condições otimizadas

Amostra	Protease (U/g)	Lipase (U/g)	Celulase (U/g)
X	0,1557 ±0,011 <sup>a</sup>	14,5260 ±0,32 <sup>a</sup>	0,3239 ±0,018 <sup>c</sup>
C1	0,0561 ±0,016 <sup>b</sup>	7,9804 ±1,26 <sup>d</sup>	0,3723 ±0,003 <sup>c</sup>
C2	0,0469 ±0,035 <sup>b</sup>	0,00 <sup>e</sup>	0,1348 ±0,048 <sup>d</sup>

Letras diferentes na mesma coluna indicam diferença significativa (Tukey  $p < 0,10$ )  
Média da triplicata da análise ± desvio padrão

## 4. Discussão

### 4.1. Otimização das condições de fermentação para produção do natto com elevada atividade antioxidante

Na avaliação dos efeitos sobre a atividade antioxidante (Tabela 2) os resultados foram significativos ( $p < 0,10$ ) para as variáveis independentes temperatura ( $X_2$ ), tempo de fermentação ( $X_3$ ) e a interação entre inóculo e temperatura ( $X_1 \cdot X_2$ ). A variável independente temperatura (Q) e a interação entre o inóculo e a temperatura apresentaram um efeito positivo na resposta, ou seja, a elevação desses fatores aumenta a atividade antioxidante, enquanto o tempo de incubação (L) teve um efeito negativo.

O coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi igual a 0,68 indicando que 68% dos dados experimentais ajustaram-se ao modelo polinomial proposto. A falta de ajuste foi não significativa, portanto este modelo é útil para fins preditivos e foi possível construir os gráficos de superfície de resposta (Figuras 1, 2 e 3).

Analisando a interação entre as variáveis  $X_1$  (inóculo) e  $X_2$  (temperatura) na superfície de resposta (Figura 1) observa-se maiores valores de atividade antioxidante com o aumento do inóculo e o aumento da temperatura. Ishihara e colaboradores (2007) em seu trabalho com extrato de soja e tofu, sugeriram que a relação positiva da atividade antioxidante e a temperatura de produção se deve ao auxílio do tratamento térmico na

bioconversão de isoflavonas, acumulando a forma aglicona que relata-se estar associada ao aumento de atividade antioxidante. O mesmo pode-se concluir sobre a influência do aumento do inóculo, que aumenta a produção de  $\beta$ -glicosidase que hidrolisa a forma glicosilada das isoflavonas.

Na interação entre as variáveis  $X_1$  (inóculo) e  $X_3$  (tempo de fermentação) na superfície de resposta (Figura 2) por sua vez apresenta uma área ampla de atividade ótima próximo a tempos menores de fermentação. Zhu e colaboradores (2008) sugerem a fermentação com *B. subtilis* para enriquecer o *okara*, resíduo da produção de extrato aquoso de soja, por aumentar seu teor de capacidade antioxidante e observam um declínio desta variável após certo tempo de fermentação.

Na figura 3 é possível analisar a interação entre as variáveis  $X_2$  (temperatura) e  $X_3$  (tempo de fermentação) na superfície de resposta observa-se maiores valores de atividade antioxidante em altas e baixas temperaturas com tempos menores de fermentação. Este resultado difere do obtido por Huang e colaboradores (2011) em sua pesquisa com *sufu*, produto feito de tofu fermentado muito apreciado na China, onde obtiveram a maior atividade antioxidante com a fermentação a 45° C por 16 dias, tempo e temperatura máxima analisada.

O gráfico do Perfil dos Valores Preditos e Desejabilidade para a produção do natto (Figura 4) auxilia na determinação das melhores condições de preparo variando os 3 fatores inóculo (UFC/mL), temperatura (° C) e tempo (h) na busca de uma alimento com alta atividade antioxidante

(desejabilidade 1). Os efeitos dos fatores sobre a atividade antioxidante não convergiram. Porém, tal fato pode ser um indicativo da proximidade das condições ótimas nas condições estipuladas no experimento. O maior valor da variável resposta foi obtido com  $10^9$  UFC/mL, 45° C e 36 h.

#### 4.2. Análise da composição centesimal do natto em pó produzido em condições otimizadas

Os valores descritos na Tabela 3 condizem com os reportados por Shanmugasundaram e colaboradores (1991), que encontraram no natto 59% de umidade, 16,5% de proteína, 10% de lipídeo e 1,9% de cinzas e com o descrito por OHTA (1986): 59,5% de umidade, 16,5% de proteína e 10% de lipídeo.

No *kinema*, produtos fermentado similar ao natto, por sua vez é relatado proporções de 61,7 – 63,8% de umidade, 47,9 – 49,0% de proteína, 14,8 – 17,7% de lipídeo, 4,8 – 5,9% de cinzas e 27,4 – 32,5% de carboidratos em fermentações que podem durar até 3 dias (SARKAR et al., 1994). Tal diferença no teor de proteínas em comparação com o natto se deve a fermentação natural ser realizada não apenas pela bactéria *B. subtilis*, mas também por outras bactérias (*Enterococcus faecium*) e leveduras (*Candida parapsilosis*, *Geotrichum candidum*) havendo assim um consumo diferente da proteína durante a fermentação.

#### 4.3. Análise enzimática do natto em pó produzido em condições otimizadas

A diferença encontrada entre a atividade do natto X e o controle dos grãos *in natura* (C1) mostra a contribuição da bactéria na produção destas enzimas. Os baixos valores encontrados no controle cozido não fermentado (C2) podem indicar desnaturação pelo cozimento em autoclave a 121° C.

A atividade de protease foi mais baixa que à observada em outros trabalhos com produtos similares (OMAFUVBE et al., 2000; INATSU et al., 2006).

Os valores encontrados para a atividade de lipase condizem com outros estudos com produtos fermentados de soja análogos ao natto, e de uma maneira geral são considerados pequenos. Omafuvbe e colaboradores (2000) observaram o valor de  $1,17 \pm 0,17$  U/mL para 24 h de fermentação no *soy-daddawa*. Chukeatirote e colaboradores (2006) por sua vez obtiveram 1,10 U/mL no *Thua nao* para o mesmo tempo de incubação.

### 5. Conclusão

Por meio das análises da metodologia de superfície de resposta foi possível determinar as melhores condições de preparo do natto para obtenção de elevada atividade antioxidante, com o máximo de 1,23 µM de Trolox/g encontrado com  $10^9$  UFC/mL, 45° C e 36 h de incubação.

### 6. Agradecimentos

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Profa. Dra Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi pela doação da cepa de *Bacillus subtilis* Natto para a execução deste trabalho.

### 7. Referências

- CHUKEATIROTE, E.; CHAINUN, C.; SIENGSUBCHART, A.; MOUKMNERD, C.; CHANTAWANNAKUL, P.; LURNYONG, S.; BOONTIM, N. e THAKANG, P. Microbiological and Biochemical changes in Thua nao Fermentation. **Research Journal of Microbiology**, v. 1, n 1, p 38-44, 2006.
- DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350–356, 1956.
- ERNANDES, F. M. P. G. Utilização de diferentes substratos para a produção de etanol, levana e sorbitol por *Zymomonas mobilis*. Tese apresentada

- como requisitos para obtenção do Título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 167 p., 2009.
- GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C. R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 246–251, 2003.
- HU, Y.; GE, C.; YUAN, W.; ZHU, R.; ZHANG, W.; DUC, L. E XUEB, J. Characterization of fermented black soybean natto inoculated with *Bacillus* natto during fermentation. **Journal of Science Food and Agricultural**, v 90, p 1194–1202, 2010.
- HUANG, Y.; LU, T. and CHOU, C. Ripening temperature affects the content and distribution of isoflavones in *sufu*, a fermented soybean curd. **International Journal of Food Science and Technology**, v 46, p. 257–262, 2011.
- INATSU, Y.; NAKAMURA, N.; YURIKO, Y.; FUSHIMI, T.; WATANASIRITUM, L. e KAWAMOTO, S. Characterization of *Bacillus subtilis* strains in Thua nao, a traditional fermented soybean food in northern Thailand. **Journal compilation , The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology**, v 43, p 237–242, 2006.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, p. 21-22. 1985.
- ISHIHARA, M.; SINGH, H.; CHUNG, G.; TAM, C. Content composition and antioxidant activity of isoflavones in commercial and homemade soymilk and tofu. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v 87, Issue 15, p. 2844–2852, 2007.
- LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N., MITCHELL, D.A.; BARATTI, J.C., FILLIPPIS, I.; FONTANA, J.D. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 31, p. 53–61, 2004.
- OHTA T. Natto. Capítulo 5 em *Legume-based Fermented Foods* NR Reddy MD Pierson. D Merle, DK Salunkhe, CRC Press. p. 85-93, 1986.
- OMAFUVBE, B. O.; SHONUKAN, O. O.; ABIOSE S. H. Microbiological and biochemical changes in the traditional fermentation of soybean for ‘soy-daddawa’ – Nigerian food condiment. **Food Microbiology**, no 17, p. 469-474, 2000.
- SARKAR, P. K. ; TAMANG, J. P.; COOK, P. E. and OWENS, J.D. Kinema - a traditional soybean fermented food: proximate composition and microflora. **Food Microbiology**, v 11, p. 47- 55, 1994.
- SHANMUGASUNDARAM, S., S.-T. CHENG, M.-T. HUANG; M.-R. YAN. Varietal Improvement of Vegetable Soybean in Taiwan, in **Vegetable Soybean: Research Needs for Production and Quality Improvement**, edited by S. Shanmugasundaram, Asian Vegetable Research and Development Center, p. 30 – 42, 1991.
- WU, C. and CHOU, C. Enhancement of Aglycone, Vitamin K2 and Superoxide Dismutase Activity of Black Soybean through Fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC 14715 at Different Temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v 57, n 22, p. 10695–10700, 2009.
- ZHU, Y.P.; FAN, J.F.; CHENG, Y.Q.; LI, L.T. Improvement of the antioxidant activity of Chinese traditional fermented okara (Meitauza) using *Bacillus subtilis* B2. **Food Control**, v 19, Issue 7, p. 654–661, 2008.

#### **5.4 ARTIGO CIENTÍFICO 4**

Título: Efeito das condições de fermentação na produção de natto em enzimas com atividade de  $\beta$ -glicosidase.

# Efeito das condições de fermentação na produção de natto em enzimas com atividade de $\beta$ -glicosidase

R. F. C. Badini, et al.

*Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, Departamento de Bioquímica e Biotecnologia, Universidade Estadual de Londrina (UEL), Rod. Celso Garcia Cid, Km 380, CP 6001 – 95070-560 Londrina – PR, Brasil.*

## Resumo

O Natto é um alimento proteico, de elevado valor nutritivo, obtido por fermentação dos grãos de soja pela bactéria *Bacillus subtilis* Natto. No processo fermentativo as enzimas produzidas pela bactéria promovem a biotransformação das isoflavonas para forma bioativa aglicona, que apresenta efeitos benéficos à saúde. O presente trabalho teve como objetivo investigar o efeito de diferentes quantidades de inóculo, temperaturas e tempos de fermentação na elaboração de natto com elevada atividade de  $\beta$ -glicosidase por fermentação de grãos de soja com *B. subtilis* Natto utilizando um Delineamento Composto Central ( $2^3$ ) com variação do inóculo de  $10^3$  –  $10^9$  UFC/mL, da temperatura de 25 – 45° C e do tempo de fermentação de 12 – 36 h. Obteve-se um natto com elevada atividade de  $\beta$ -glicosidase (0,008 UA/g) na condição de  $10^9$  UFC/mL de inóculo e fermentação de 24 h a 35° C.

*Palavras chaves:* soja, natto,  $\beta$ -glicosidase

## Introdução

Enzimas de origem microbiana são utilizadas em inúmeros processos nas mais diversas áreas tecnológicas, por apresentarem vantagens como menor tempo de produção (OLIVEIRA et al., 2007) e pela possibilidade de sua concentração ser potencialmente induzida ou aumentada através de diversas modificações no cultivo (BUSTO et al., 1995).

A  $\beta$ -glicosidase é uma enzima com múltiplas isoformas, que catalisa diversas reações e vem sendo utilizada em varias aplicações. Entre as possibilidades de aplicação destaca-se a hidrólise de isoflavonas glicosiladas em isoflavonas agliconas. Isoflavonas agliconas são compostos fenólicos presente nos vegetais com estrutura e função similar ao estrogênio humano e associada ao tratamento preventivo de diversas doenças (LIGGINS et al., 2000; NAGATA et al., 2007; KANG et al., 2010; DONG; QIN, 2011; CHEN et al., 2003; IKEDA et al., 2006).

A bactéria *Bacillus subtilis* Natto, utilizada na fermentação do natto, um alimento típico oriental composto por grãos de soja fermentados, é descrita como produtora de enzima com atividade de  $\beta$ -glicosidase observada no natto (IBE et al., 2001) e em produtos similares (CHOI et al., 2007; CHO et al., 2009, 2011; HU et al., 2010) sendo relacionada ao acúmulo de isoflavonas agliconas no produto final.

Pesquisas sobre o natto ainda são escassas, sendo uma área a se trabalhar, uma vez que maiores conhecimentos sobre sua composição e as modificações promovidas pelo processo fermentativo permitem maior esclarecimento sobre seus benefícios. O objetivo do presente foi investigar o efeito de diferentes quantidades de inóculo, temperaturas e tempos de fermentação na elaboração de natto com elevada atividade de  $\beta$ -glicosidase por fermentação de grãos de soja com *B. subtilis* Natto utilizando um Delineamento Composto Central ( $2^3$ ).

## Materiais e métodos

### *Matéria-prima*

Foram utilizados grãos de soja da cultivar BRS 216, desenvolvida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA Soja) – Londrina/PR, Brasil, para a produção do natto. Os grãos foram submetidos à uma seleção prévia.

A cepa utilizada de *B. subtilis* Natto (CCT 7712) foi isolada no Departamento de Bioquímica e Biotecnologia da Universidade Estadual de Londrina PR, Brasil, identificada pela Fundação André Tosello SP, Brasil.

### *Métodos*

#### *Produção do natto*

##### *Preparo do inóculo*

A metodologia empregada para o preparo do inóculo de *B. subtilis* Natto foi descrita por Hu e colaboradores (2010). A *B. subtilis* Natto foi preservada em meio de cultivo contendo (g/L): peptona, 50; extrato de carne, 30; e ágar, 60, incubado a 37° C por 48 h e estocado a 4° C. A cepa em ágar inclinado foi transferida e cultivada em 10 mL de caldo nutriente (NB) composto por peptona, 5 g/L, e extrato de carne, 3 g/L. Após 48 h a 37° C, o cultivo foi centrifugado a 5000 xg por 10 min e o pellet de células ressuspenso em 5 mL de água estéril contendo 8,5 g/L de NaCl, pH 7 e, posteriormente, diluído até a população viável necessária, conforme experimentos.

A contagem das unidades formadoras (UFC) de colônias da bactéria foi realizada em microscópio, utilizando Câmara de Neubauer, e associada a diluições do meio de cultivo líquido por meio de uma curva de turbidimetria, segundo Ernandes (2009).

##### *Preparo dos grãos de soja para a fermentação*

Os grãos de soja foram lavados, embebidos em água à temperatura ambiente (28° C) por aproximadamente 14 h, até o dobro do peso inicial e, em seguida, drenados. Os grãos hidratados foram cozidos no vapor a 121° C (1kg/cm<sup>2</sup>) por 20 min em autoclave. Os grãos cozidos foram imediatamente cobertos com uma folha de alumínio, resfriados até 28° C e pesados (WEI et al., 2001).

##### *Fermentação dos grãos de soja para a produção do natto*

A fermentação dos grãos de soja com *B. subtilis* Natto foi realizada segundo Wu e Chou (2009). 5 mL do inóculo foram adicionados a 100 g da soja cozida, misturados cuidadosamente e cobertos com filme plástico perfurado na parte superior. A soja inoculada foi fermentada em Shaker a 25, 35 e 45° C por 12, 24 e 36 h.

##### *Delineamento Experimental e Análises Estatísticas*

Para determinação das condições ótimas de produção do natto com elevado teor de isoflavonas agliconas foi realizado um planejamento experimental com esquema fatorial 2<sup>3</sup>, com três repetições do ponto central, e três níveis totalizando 17 ensaios (Tabela 1).

Foi avaliada a influência das variáveis independentes X<sub>1</sub> = inóculo (UFC/mL), X<sub>2</sub> = temperatura (° C) e X<sub>3</sub> = tempo de fermentação (h) na atividade de β-glicosidase (UA/g).

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 10% e plotados os mapas de superfície de resposta utilizando-se o programa STATISTICA 7.0 da StatSoft, Inc, Tulsa, OK, USA (2004).

Foi produzido um natto na melhor condição de preparo para obtenção de elevada atividade de  $\beta$ -glicosidase. O natto obtido foi homogeneizado, liofilizado, moído e congelado até o momento da análise.

#### *Determinação da atividade de $\beta$ -glicosidase*

Para a determinação da atividade de  $\beta$ -glicosidase foi utilizado o substrato sintético cromogênico  $p$ -nitrofenil- $\beta$ -D-glicopiranosídeo ( $p$ -NPG) conforme procedimento descrito por Matsuura e Obata (1993). Foram 2 mL de  $p$ -NPG 1mM, em tampão fosfato-citrato 0,1 M, pH 5,0, mantidos em banho Maria a 30° C por 10 min de pré-incubação. Em sequência, foram adicionados 0,5 mL do extrato e novamente colocados em banho Maria a 30° C por 30 min para incubação. Após a reação ser interrompida, pela adição de 2,5 mL de carbonato de sódio 0,5 M, a liberação de  $p$ -NP foi determinada em espectrofotômetro a 420 nm, e quantificada utilizando uma curva padrão (0,01 – 0,11  $\mu$ mol/mL). Uma unidade da atividade enzimática foi definida como a quantidade de enzima necessária para liberar 1  $\mu$ mol de  $p$ -NP/min nas condições de ensaio.

## **Resultados e Discussão**

#### *Análise da variável atividade de $\beta$ -glicosidase*

Na tabela 1 observa-se os valores obtidos e estimados de atividade de  $\beta$ -glicosidase para cada ensaio realizado. Obteve-se no ensaio 10 a maior atividade enzimática ( $X_1$  = inóculo  $10^9$  UFC/mL;  $X_2$  = 35° C;  $X_3$  = 24 h) indicando possuir condições mais adequadas para produção da enzima. Por outro lado, a menor atividade foi obtida no ensaio 8 ( $X_1$  = inóculo  $10^9$  UFC/mL;  $X_2$  = 45° C;  $X_3$  = 36 h), possivelmente devido ao tempo prolongado em alta temperatura que pode ter ocasionado a desnaturação da enzima.

Os resultados da análise de variância (ANOVA) dos dados obtidos para a variável resposta atividade de  $\beta$ -glicosidase podem ser observados na Tabela 2.

Na avaliação dos efeitos sobre a atividade enzimática, observa-se que os resultados foram significativos ( $p < 0,10$ ) para as variáveis independentes  $X_1$  (inóculo),  $X_2$  (temperatura) e  $X_3$  (tempo de fermentação). Não houve influência significativa para as interações (Tabela 2).

A variável independente inóculo (L) apresentou um efeito positivo na resposta, ou seja, sua elevação aumenta a função resposta, enquanto a temperatura (Q) e o tempo de fermentação (Q) tiveram um efeito negativo. O modelo polinomial (Y) que representa o efeito das variáveis na atividade de  $\beta$ -glicosidase presente no natto pode ser descrito conforme a Equação 1.

$$Y = 0,006087 + 0,000704x_1 - 0,001421x_2^2 - 0,002781x_3^2$$

A falta de ajuste do modelo foi significativa ao nível de 90 % e o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) foi igual a 0,87 indicando que 87% dos dados experimentais ajustaram ao modelo polinomial proposto.

A partir do modelo polinomial proposto (Equação 1) foi possível construir as superfícies de resposta (Figuras 1, 2 e 3) que possibilitaram uma melhor visualização da resposta, considerando as variáveis e suas interações.

**Tabela 1:** Valores observados e preditos da atividade de  $\beta$ -glicosidase nos nattos produzidos

Ensaio	Inóculo (UFC/mL)		Temperatura (°C)		Incubação (h)		Atividade de $\beta$ - glicosidase (UA/g)
	x <sub>1</sub> **	X <sub>1</sub> ***	x <sub>2</sub> **	X <sub>2</sub> ***	x <sub>3</sub> **	X <sub>3</sub> ***	
1	-1	10 <sup>3</sup>	-1	25	-1	12	0,00241
2	-1	10 <sup>3</sup>	-1	25	1	36	0,00236
3	-1	10 <sup>3</sup>	1	45	-1	12	0,00315
4	-1	10 <sup>3</sup>	1	45	1	36	0,00270
5	1	10 <sup>9</sup>	-1	25	-1	12	0,00319
6	1	10 <sup>9</sup>	-1	25	1	36	0,00356
7	1	10 <sup>9</sup>	1	45	-1	12	0,00626
8	1	10 <sup>9</sup>	1	45	1	36	0,00214
9	-1	10 <sup>3</sup>	0	35	0	24	0,00549
10	1	10 <sup>9</sup>	0	35	0	24	0,00800
11	0	10 <sup>6</sup>	-1	25	0	24	0,00426
12	0	10 <sup>6</sup>	1	45	0	24	0,00399
13	0	10 <sup>6</sup>	0	35	-1	12	0,00250
14	0	10 <sup>6</sup>	0	35	1	36	0,00303
15*	0	10 <sup>6</sup>	0	35	0	24	0,00724
16*	0	10 <sup>6</sup>	0	35	0	24	0,00647
17*	0	10 <sup>6</sup>	0	35	0	24	0,00672

\*Pontos centrais

\*\* Valores codificados

\*\*\* Valores reais

**Tabela 2:** Análise ANOVA da atividade de  $\beta$ -glicosidase para a otimização da produção do natto

Fonte de variação	Soma quadrática	Graus de Liberdade	Média quadrática	Teste F	p*
Inóculo (L)	0,000005	1	0,000005	4,33075	0,075968
Inóculo (Q)	0,000004	1	0,000004	3,36810	0,109104
Temperatura (L)	0,000001	1	0,000001	0,52880	0,490713
Temperatura (Q)	0,000005	1	0,000005	4,72445	0,066266
tempo (L)	0,000001	1	0,000001	1,20922	0,307862
tempo (Q)	0,000021	1	0,000021	18,10072	0,003772
Inóculo x T	0,000000	1	0,000000	0,03549	0,855922
Inóculo x tempo	0,000001	1	0,000001	1,15370	0,318400
Temperatura x t	0,000003	1	0,000003	2,61183	0,150103
Erro	0,000008	7	0,000001		
Total	0,000061	16			
R <sup>2</sup>			0,87		

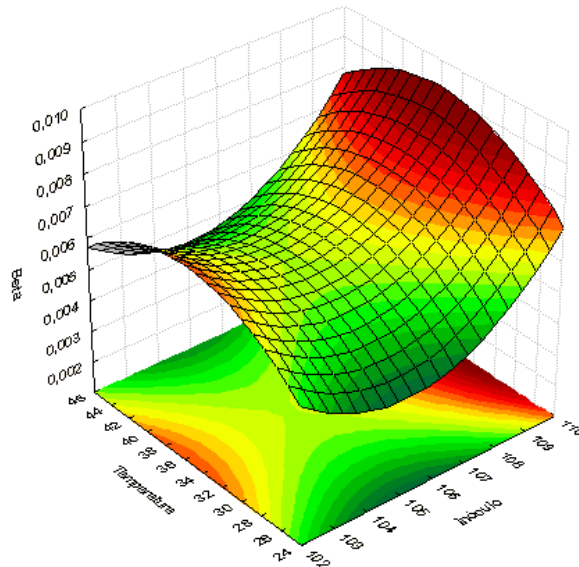
\*p &lt; 0,10 são considerados significativos

Wu e Chou (2009) relataram em seu trabalho a produção da enzima  $\beta$ -glicosidase pela bactéria *B. subtilis* Natto na produção de natto de soja preta e evidenciam sua maior atividade durante a incubação. Além disso, Brijwani e colaboradores (2010) relatam 30° C como temperatura ótima para a produção da enzima em fermentação em estado sólido utilizando soja, valor próximo ao ensaio com melhor resultado.

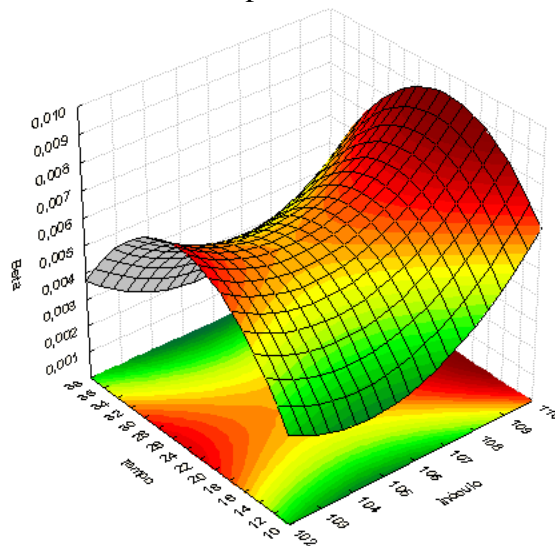
Analisando a interação entre as variáveis X<sub>1</sub> (inóculo) e X<sub>2</sub> (temperatura) na superfície de resposta (Figura 1) observa-se uma região ótima na direita, indicando uma maior atividade de  $\beta$ -glicosidase. Os melhores resultados foram observados com o aumento do

inóculo na região central de valores de temperatura, devido ao aumento da produção da enzima pelo aumento das unidades formadoras de colônia da bactéria produtora. A produção desta enzima também foi observada em outros produtos a base de soja fermentados com espécies de *Bacillus* (CHOI et al., 2007; WU; CHOU, 2009; CHO et al., 2009; 2011; HU et al., 2010).

**Figura 1:** Superfície de resposta para efeito da concentração de inóculo (UFC/mL) e temperatura ( $^{\circ}$  C) na atividade de  $\beta$ -glicosidase de enzima presente no natto



**Figura 2:** Superfície de resposta para efeito da concentração de inóculo (UFC/mL) e tempo (h) na atividade de  $\beta$ -glicosidase de enzima presente no natto

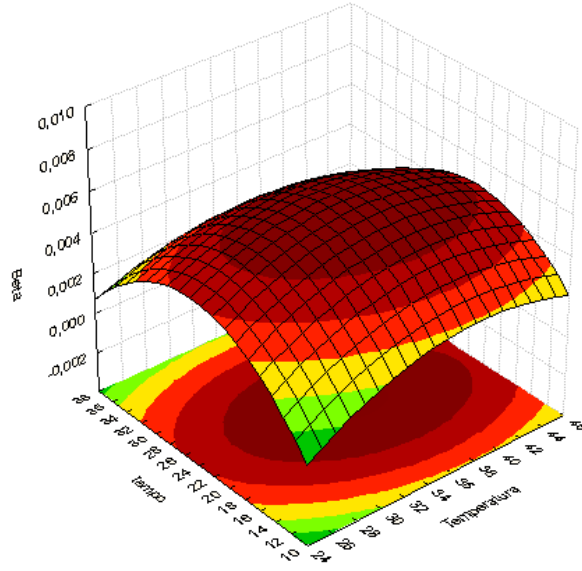


Analisando a interação entre as variáveis  $X_1$  (inóculo) e  $X_3$  (tempo de fermentação) na superfície de resposta (Figura 2) observa-se maiores valores de atividade de  $\beta$ -glicosidase em uma ampla faixa de concentração de inóculo na região central de tempo de fermentação. Tal fato pode indicar uma baixa influência do inóculo na função resposta nas condições centrais (temperatura de  $35^{\circ}$  C; tempo de fermentação de 24 h) de produção do natto.

Nas condições analisadas de interação entre as variáveis  $X_2$  (temperatura) e  $X_3$  (tempo de fermentação) na superfície de resposta (Figura 3) a atividade enzimática máxima

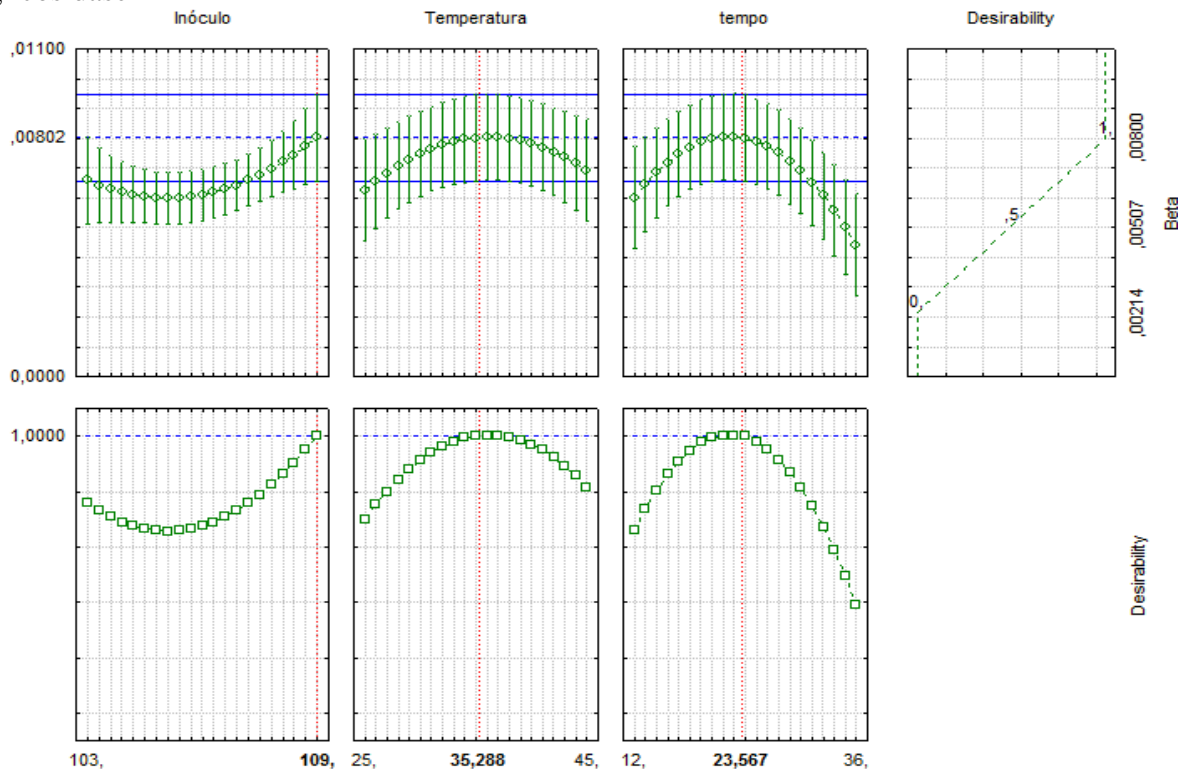
foi observada em um amplo intervalo de temperatura (30 – 40° C) e tempo de incubação (18 – 28 h), abrangendo o ponto central do experimento.

**Figura 3:** Superfície de resposta para efeito da temperatura (° C) e do tempo (h) na atividade de β-glicosidase de enzima presente no natto



No gráfico do Perfil dos Valores Preditos e Desejabilidade (Figura 4) são apresentados, na quarta coluna, os níveis das variáveis independentes estipulados e o desejo correspondente para cada resposta, sendo que o número 1 (um) corresponde a uma resposta muito desejável (ideal), e assim por diante até o número 0 (zero) que corresponde a uma resposta indesejável.

**Figura 4:** Gráfico do perfil desejável para a produção de natto com elevada atividade de β-glicosidase



Por esse perfil observa-se que a faixa de valores das variáveis independentes escolhida neste experimento foi adequada, gerando uma convergência para maiores valores de atividade, com o máximo encontrado com  $10^9$  UFC/mL,  $35^\circ\text{C}$  e 24 h.

Enzima com atividade de  $\beta$ -glicosidase presente na microflora intestinal pode hidrolisar as isoflavonas glicosiladas em agliconas promovendo a sua absorção (PYO et al., 2005). Assim, bactérias produtoras dessa enzima são potencialmente importantes na geração de produtos com alta estrogenicidade e melhor absorção, facilitando a biodisponibilidade das isoflavonas.

No ensaio de validação foi produzido, em triplicata, um natto nas condições de  $10^9$  UFC/mL de inóculo e fermentado à  $35^\circ\text{C}$  por 24 h. Substituindo tais condições na equação do modelo matemático proposto encontramos o valor de 0,0012 U/mL de atividade de  $\beta$ -glicosidase, que difere do valor observado no ensaio de validação de  $0,0048 \pm 0,001$  U/mL, provavelmente devido à falta de ajuste do modelo.

### Conclusão

Por meio das análises da metodologia de superfície de resposta foram selecionadas as melhores condições de preparo para obtenção do natto com o teor mais elevado de atividade de  $\beta$ -glicosidase, 0,008 UA/g, na condição de  $10^9$  UFC/mL de inóculo e fermentação de 24 h a  $35^\circ\text{C}$ .

### Agradecimentos

À Coordenadoria de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudo.

À Profa. Dra Maria Antonia Pedrine Colabone Celligoi pela doação da cepa de *Bacillus subtilis* Natto para a execução deste trabalho.

### Referências

- BRIJWANI, K.; OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. **Process Biochemistry**, v 45, Issue 1, p. 120–128, 2010.
- CHEN, Y.; HO, S. C.; LAM, S. S. H.; HO, S. S. S. and WOO, J.L. F. Soy Isoflavones Have a Favorable Effect on Bone Loss in Chinese Postmenopausal Women with Lower Bone Mass: A Double-Blind, Randomized, Controlled Trial. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v 88, n 10, p. 4740–4747, 2003.
- CHO, K. M.; HONG, S. Y.; MATH, R. K.; LEE, J. H.; KAMBIRANDA, D. M.; KIM, J. M.; ISLAM, S. M. A.; YUN, M. G.; CHO, J. J.; LIM, W. J.; YUN, H. D. Biotransformation of phenolics (isoflavones, flavanols and phenolic acids) during the fermentation of *cheonggukjang* by *Bacillus pumilus* HY1. **Food Chemistry**, n 114, p. 413-419, 2009.
- CHOI, Y. M.; KIM, Y. S.; RA K. S.; SUH, H.J. Characteristics of fermentation and bioavailability of isoflavones in Korean soybean paste (doejang) with application of *Bacillus* sp. KH-15. **International Journal of Food and Science and Technology**, n 42, p. 1497 – 1503, 2007.
- DONG, J. e QIN, L. Soy isoflavones consumption and the risk of breast cancer incidence or recurrence: a meta-analysis of prospective studies. **Breast Cancer Research and Treatment**. Springer Science and Business n 125, p. 315 – 323, 2011.
- ERNANDES, F. M. P. G. Utilização de diferentes substratos para a produção de etanol, levana e sorbitol por *Zymomonas mobilis*. Tese apresentada como requisitos para obtenção do Título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 167 p., 2009.

- HU, Y.; GE, C.; YUAN, W.; ZHU, R.; ZHANG, W.; DUC, L. E XUEB, J. Characterization of fermented black soybean natto inoculated with *Bacillus natto* during fermentation. **Journal of Science Food and Agricultural**, v 90, p 1194–1202, 2010.
- IBE, S.; KUMADA, K.; YOSHIBA, M.; ONGA, T. Production of natto which contains a high level of isoflavone aglycons. **Journal Nippon Shokuhin Kagaku Kogakukai**, Tsukuba, JAPON, v 48, n 1, p. 27-34, 2001.
- IKEDA, Y.; IKI, M.; MORITA, A.; KAJITA, E.; KAGAMIMORI, S.; KAGAWA, Y.; e YONESHIMA, H. Intake of Fermented Soybeans, Natto, Is Associated with Reduced Bone Loss in Postmenopausal Women: Japanese Population-Based Osteoporosis (JPOS) Study. **American Society for Nutrition**, 2006.
- KANG, X.; ZHANG, Q.; WANG, S.; HUANG, X.; JIN, S. Effect of soy isoflavones on breast cancer recurrence and death for patients receiving adjuvant endocrine therapy. **Canadian Medical Association Journal**, v 182, n 17, p. 1857 – 1862, 2010.
- LIGGINS, J.; BLUCK, L. J.C.; RUNSWICK, S.; ATKINSON, C.; COWARD, W.A.; BINGHAM, S. A. Daidzein and genistein content of fruits and nuts. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, p. 326-331, 2000.
- MATSUURA, M.; OBATA, A.  $\beta$ -Glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 1, p. 144-147, 1993.
- NAGATA, Y.; SONODA, T.; MORI, M.; MIYANAGA, N.; OKUMURA, K.; GOTO, K.; NAITO, S.; FUJIMOTO, K.; HIRAO, Y.; TAKAHASHI, A.; TSUKAMOTO, T.; AKAZA, H. Dietary Isoflavones May Protect against Prostate Cancer in Japanese Men. **American Society for Nutrition**, 2007.
- PYO, Y.; LEE, T.; LEE, Y.. Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with  $\beta$ -glucosidase-producing lactic acid bacteria. **Food Research International**, no 38, p. 551 – 559, 2005.
- WEI, Q.; HALL, W.; CHANG, K.C. Natto characteristics as affected by steaming time, *Bacillus* strain, and fermentation time. **Journal of food science**, v 66, n 1, p. 167-173, 2001.
- WU, C. and CHOU, C. Enhancement of Aglycone, Vitamin K2 and Superoxide Dismutase Activity of Black Soybean through Fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC 14715 at Different Temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v 57, n 22, p. 10695–10700, 2009.

## 6 CONCLUSÃO

Os grãos de soja utilizados foram adequados a produção do natto e o procedimento utilizado levou à produtos com características típicas do natto nas condições otimizadas.

Por meio das análises da metodologia de superfície de resposta foram selecionadas as melhores condições para obtenção de maiores valores de atividade da enzima  $\beta$ -glicosidase, com o máximo encontrado com  $10^9$  UFC/mL, 24 h de incubação à 35° C. Para a atividade antioxidante o maior valor foi obtido com  $10^9$  UFC/mL e 20 h de incubação à 45° C. Para um natto com elevado teor de isoflavonas agliconas, por sua vez, as condições ideais foram  $10^3$  UFC/mL com 12 h de fermentação à 25° C. Os valores de inóculo, tempo de fermentação e temperatura não convergiram na análise de enriquecimento com as três variáveis respostas, exigindo a escolha de um fator para beneficiar o produto final.

Foram produzidos dois nattos, um com elevado teor de atividade antioxidante e outro com elevado teor de isoflavonas agliconas, variáveis de interesse para um produto funcional. O natto gerado foi liofilizado e caracterizado quanto a sua composição centesimal e atividade de protease, lipase e celulase. A produção na forma seca em pó elimina a barreira imposta pela característica visual e também facilita o transporte comercial, o armazenamento e a formulação de outros produtos.

Além dos componentes de interesse, estudados nesta pesquisa, o natto em pó se mostrou um alimento proteico revelando um forte potencial funcional por agregar os benefícios nutricionais da soja com a vantagem de ser um produto fermentado.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, C. L. Isoflavonas de soja e propriedades biológicas. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 20, p. 323-334, 2002.
- AGUIAR, C. L.; ALENCAR, S. M.; MUI TSAI, S.; PARK, Y. K. Transformações enzimáticas de flavonóides. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 25, no 1, p 61-76 , 2007.
- AGUIAR, C. L.; PARK, Y. K. Conversão de Daidzina e Genistina de Soja por  $\beta$ -glicosidase de *Aspergillus oryzae*. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 22, no 1, p.183 – 195, 2004.
- AGRO NIPPO. Disponível em: <http://www.natto.com.br/>. Acessado em: 15/04/2011.
- ALBRECHT, L. P.; BRACCINI, A. L.; ÁVILA, M. R.; SUZUKI, L. S.; SCAPIM, C. A.; BARBOSA, M. C. Teores de óleo, proteínas e produtividade de soja em função da antecipação da semeadura na região oeste do Paraná. **Bragantia**, v.67, no 4, p.865-873, 2008.
- ALI, N. Soybean Processing and Utilization. In: SINGH, G. The Soybean: Botany, Production and Uses. Edited Department of Plant Breeding and Genetics Punjab Agricultural University Ludhiana, India, Ed CABI Publishing, p 345-375, 2010.
- ARAI, Y.; WATANABE, S.; KIMIRA, M.; SHIMOI, K.; MOCHIZUKI, R. e KINAE, N. Dietary Intakes of Flavonols, Flavones and Isoflavones by Japanese Women and the Inverse Correlation between Quercetin Intake and Plasma LDL Cholesterol Concentration. **American Society for Nutritional Sciences**, 2000.
- ASTUTI, M.; MELIALA, A.; DALAIS, F. S.; WAHLQVIST, M. L. Tempe, a nutritious and healthy food from Indonesia. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 9, p. 322-325, 2000.
- ÁVILA, M. R., BRACCINI, A. L., SCAPIM, C. A.; MANDARIN, J. M. G.; ALBRECHT, L. P. e FILHO, P. S. V. Componentes do rendimento, teores de isoflavonas, proteínas, óleo e qualidade de sementes de soja. **Revista Brasileira de Sementes**, vol. 29, n 3, p. 111-127, 2007.
- AZOKPOTA, P.; HOUNHOUIGAN, D.J.and NAGO, M.C. Microbiological and chemical changes during the fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) to produce afitin, iru and sonru, three traditional condiments produced in Benin. **International Journal of Food Microbiology**, v 107, p. 304 – 309, 2006.
- BARBOSA, A. C. L.; HASSIMOTTO, N. M. A.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Teores de isoflavonas e Capacidade Antioxidante da Soja e Produtos Derivados. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v 26, n 4, p. 921-926, 2006.
- BARBOSA, M. Z.; ASSUMPCÃO, R. Ocupação territorial da produção e da agroindústria da soja no Brasil, nas décadas de 80 e 90. **Informações Econômicas**, v 11, n 31, p. 7-16, 2001.

BARNES, S.; PETERSON, G. T.; COWARD, L. Rationale for the use of genistein containing matrices in chemoprevention trials for breast and prostate cancer. **Journal of Cellular Biochemistry Supplement**, v. 22, p. 181-187, 1995.

BEDANI, R; MIGUEL, D. P.; CHAVES, I. R.; JUNG, E. B.; OLIVEIRA, P. F.; GUAGLIANONI, D. G.; ROSSI, E. A. Consumo de Soja e seus Produtos Derivados na Cidade de Araraquara -SP: Um Estudo de Caso. **Alimentos e Nutrição**, v 18, p. 27-34, 2007.

BEHRENS, J. H; ROIG, S. M; DA SILVA, M. A. A. P. Aspectos de funcionalidade, de rotulagem e de aceitação do extrato hidrossolúvel de soja fermentado e culturas lácteas probióticas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v 34, p. 99-106, 2001.

BEHRENS, JH e DA SILVA M. A. A. P. Atitude do Consumidor em Relação à Soja e Produtos Derivados. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v 24, p. 431-439, 2004.

BERHOW, M.A. Modern analytical techniques for flavonoid determination. In: BUSLIG, B.S.; MANTHEY, J.A. (Ed.). **Flavonoids in the living cell**. New York: Kluwer Academic, p 61-76, 2002.

BIOFOOD. Disponível em: <http://www.biofoodsltd.com/Soynatto.htm>. Acessado em: 15/04/2011.

BRIJWANI, K.; VADLANI, P. V. Solid State Fermentation of Soybean Hulls for Cellulolytic Enzymes Production. Em : **Soybean - Applications and Technology**, p. 305 - 322, 2010. Edited by Prof. Tzi-Bun Ng. ISBN 978-953-307-207-4. InTech. Disponível em: <http://cdn.intechweb.org/pdfs/15792.pdf>. Acessado em : 15/11/2012.

BURSSSENS, S.; PERTRY, I.; NGUDI, D. D.; KUO, Y.; MONTAGU, M.V. e LAMBEIN, F. Soy, Human Nutrition and Health. In: **Soybean and nutrition**. Ed. Hany El-Shemy, Rijeka, Croatia , p 157-180, 2011.

BOX, G. E. P., WILSON, K. B. On the experimental attainment of optimum conditions. **Journal of the Royal Statistical Society**. B13: p.1-45, 1951.

Brasil: Projeções do Agronegócio 2010-11 a 2020-21. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Assessoria de Gestão Estratégica. Brasília, 2011.

BRIJWANI, K.; OBEROI, H. S.; VADLANI, P. V. Production of a cellulolytic enzyme system in mixed-culture solid-state fermentation of soybean hulls supplemented with wheat bran. **Process Biochemistry**, v 45, Issue 1, p. 120–128, 2010

CACACE, J. E., MAZZA G. Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. **Journal of Food Science**, v.68, n.1, p.240-248, 2003.

CALLOU, K. R. A. Teor de isoflavonas e capacidade antioxidante de bebidas à base de soja. Dissertação para obtenção do título de mestre. Programa de pós-graduação em ciências dos alimentos. Faculdade de Ciências farmacêuticas. Universidade de São Paulo, São Paulo, SP. 130p., 2009.

CAMARGO, D. S.; ALVES, G.; GARCIA, S.; MIZUBUTI, I.Y. Bebida fermentada à base de soro de leite e isolado protéico de soja. **Semina: Ciências Agrárias**, v.21, No1, p. 45-51, 2000.

CARRÃO-PANIZZI; M. C.; BORDINGNON, J. R. Activity of Beta-glucosidase and levels of isoflavone glucosides in soybean cultivars affected by the environment. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, no.5, 2000.

CARRÃO-PANIZZI, M.C.; SIMÃO, A.S.; KIKUCHI, A. Efeitos de genótipos, ambientes e de tratamentos hidrotérmicos na concentração de isoflavonas agliconas em grãos de soja. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.38, n.8, p.897-902, 2003.

CARVALHO, E. R., REZENDE, P. M., OGOSHI, F. G. A., BOTREL, É. P., ALCANTARA, H. P., SANTOS, J. P. Desempenho de cultivares de soja [*Glycine max* (L.) Merrill] em cultivo de verão no sul de Minas Gerais. **Ciências e agrotecnologia**, v. 34, n. 4, p. 892-899, 2010

CHEN, Y.; HO, S. C.; LAM, S. S. H.; HO, S. S. S. and WOO, J.L. F. Soy Isoflavones Have a Favorable Effect on Bone Loss in Chinese Postmenopausal Women with Lower Bone Mass: A Double-Blind, Randomized, Controlled Trial. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v 88, n 10, p. 4740–4747, 2003.

CHO, K. M.; LEE, J. H.; YUN, H. D.; AHN, B. Y.; KIM, H.; SEO, W. T. Changes of phytochemical constituents (isoflavones, flavanols, and phenolic acids) during *cheonggukjang* soybeans fermentation using potential probiotics *Bacillus subtilis* CS90. **Journal of Food Composition and Analysis**, n 24, p. 402-410, 2011.

CHO, K. M.; HONG, S. Y.; MATH, R. K.; LEE, J. H.; KAMBIRANDA, D. M.; KIM, J. M.; ISLAM, S. M. A.; YUN, M. G.; CHO, J. J.; LIM, W. J.; YUN, H. D. Biotransformation of phenolics (isoflavones, flavanols and phenolic acids) during the fermentation of *cheonggukjang* by *Bacillus pumilus* HY1. **Food Chemistry**, n 114, p. 413-419, 2009.

CHOI, Y. M.; KIM, Y. S.; RA K. S.; SUH, H.J. Characteristics of fermentation and bioavailability of isoflavones in Korean soybean paste (doejang) with application of *Bacillus* sp. KH-15. **International Journal of Food and Science and Technology**, n 42, p. 1497 – 1503, 2007.

CHUKEATIROTE, E.; CHAINUN, C.; SIENGSUBCHART, A.; MOUKMNERD, C.; CHANTAWANNAKUL, P.; LURNYONG, S.; BOONTIM, N. e THAKANG, P. Microbiological and Biochemical changes in Thua nao Fermentation. **Research Journal of Microbiology**, v. 1, n 1, p 38-44, 2006.

COWARD, L. BARNES, N. C.; SETCHELL, K. D. R.; BARNES, S. Genistein, Daidzein and their  $\beta$ -glycoside conjugates: antitumor isoflavonas in soybean foods from American and Asian diets. **Journal of Agricultural Foods and Chemistry**, v 41, p. 1961 – 1967, 1993.

COSTA, S.I.; MIYA, E.E.; FUJITA, J.T. Composição química e qualidades organolépticas e nutricionais das principais variedades de soja cultivadas no Estado de São Paulo. **Coletânea do Instituto de Tecnologia de Alimentos**, v. 5, p. 305- 319, 1974.

DEMETRIO, A. A.; SILVA, G. D.; AGNANI, J. A. T.; SIQUEIRA L. P.; PADILHA, M. R. F.; OLIVEIRA, A. M.; SHINOHARA, N. K. S. Culinária Japonesa: alimentação saudável. Disponível em: <http://www.eventosufrpe.com.br/eventosufrpe/jepex2009/cd/resumos/R0625-3.pdf> acessado em 25/05/2011. Acessado em: 20/05/2011.

DEEPAK, V.; KALISHWARALAL, K.; RAMKUMARPANDIAN, S.; VENKATESH BABU, S.; SENTHILKUMAR, S.R.; SANGILIYANDI, G. Optimization of media composition for Nattokinase production by *Bacillus subtilis* using response surface methodology. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8170–8174, 2008.

DONG, J. e QIN, L. Soy isoflavones consumption and the risk of breast cancer incidence or recurrence: a meta-analysis of prospective studies. **Breast Cancer Research and Treatment**. Springer Science and Business no 125; p. 315 – 323, 2011.

DUBOIS, M.; GILLES, K.A.; HAMILTON, J.K.; REBERS, P.A.; SMITH, F. Colorimetric method for determination of sugars and related substances. **Analytical Chemistry**, v. 28, p. 350–356, 1956.

EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Usos da soja. Disponível em: <http://www.embrapa.gov.br/imprensa/noticias/2003/fevereiro/bn.2004-11-25.9564594260/>. Acesso em: 15/02/2012.

ERNANDES, F. M. P. G. Utilização de diferentes substratos para a produção de etanol, levana e sorbitol por *Zymomonas mobilis*. Tese apresentada como requisitos para obtenção do Título de Doutor em Engenharia e Ciência de Alimentos, junto ao programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, 167 p., 2009.

ESTEVEES, E. A. e MONTEIRO, J. B. R. Efeitos benéficos das isoflavonas de soja em doenças crônicas. **Revista de Nutrição**, v 14, no1, p 43-52, 2001.

FERNANDES, M. L. M. Produção de Lipase por fermentação em estado sólido e sua utilização em biocatálise. Dissertação apresentada como requisito parcial a obtenção do título de doutor em Química, Curso de pós-graduação em Química, Universidade Federal do Paraná. Curitiba, PR, 120 p., 2007.

FUJITA, M.; NOMURA, K.; HONG, K.; ITO, Y., ASADA, A.; NISHIMURO, S. Purification and characterization of a strong fibrinolytic enzyme (nattokinase) in the vegetable cheese natto, a popular soybean fermented food in Japan. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 197, p. 1340–1347, 1993.

FUJITA, M.; ITO, Y.; HONG, K.; NISHIMURO, S.; Characterization of Nattokinase degraded products from human fibrinogen or cross-linked fibrin. **Fibrinolysis**, v. 9, p. 157–164, 1995.

FUKUTAKE, M.; TAKAHASHI, M.; ISHIDA, K.; KAWAMURA, H.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. **Food and Chemical Toxicology**, v.34, n.5, p.457-461, 1996.

- GALDÁMEZ, E. V. C. Aplicação das Técnicas de Planejamento e Análise de Experimentos na Melhoria da Qualidade de um Processo de Fabricação de Produtos Plásticos. Dissertação apresentada como requisito parcial a obtenção do título de Mestre em Engenharia de Produção, Curso de pós-graduação Engenharia de Produção, Universidade de São Paulo. São Carlos, SP, 133 p., 2002.
- GEATER, C. W., FEHR, W. R.; WILSON, L. A.. Association of Soybean Seed Traits with Physical Properties of Natto. **Crop Science**, v. 40, 2000.
- GERMANO, S.; PANDEY, A.; OSAKU, C. A.; ROCHA, S. N.; SOCCOL, C. R. Characterization and stability of proteases from *Penicillium* sp. produced by solid-state fermentation. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 32, p. 246–251, 2003.
- GOMES, J. P.; PRUDÊNCIO, S. H., SILVA R. S. dos S. F. Queijo tipo minas frescal com derivados de soja: características físicas, químicas e sensoriais. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v.30, p.77-85, 2010.
- GOLBITZ, P. Traditional Soyfoods: Processing and Product. **The Journal of Nutrition**. v. 125, p. 570S – 572S, 1995.
- HACHMEISTER, K. A.; FUNG, D. Y. Tempeh: a mold-modified indigenous fermented food made from soybeans and/or cereal grains. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 19, p. 137-188, 1993.
- HARA, T.; AUMAYR, A.; FUJIO, Y.; UEDA, S. Elimination of plasmid-liked Polyglutamate production by *Bacillus subtilis* (*natto*) with Acridine Orange. **Applied and environmental microbiology**, p. 1456-1458, v. 44, No 6, 1982.
- HIRAOKA, N. K. e BONFLEUR, M. L. A importância do uso da soja na alimentação. Secretaria de Estado da Educação Superintendência da Educação Diretoria de Políticas e Programas Educacionais Programa de Desenvolvimento Educacional. Assis Chateaubriand, 2008.
- HORAN, F.E. Soy protein products and their production. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.51, n.1, p.67a-73a, 1974.
- HU, Y.; GE, C.; YUAN, W.; ZHU, R.; ZHANG, W.; DUC, L. E XUEB, J. Characterization of fermented black soybean natto inoculated with *Bacillus natto* during fermentation. **Journal of Science Food and Agricultural**, v 90, p 1194–1202, 2010.
- HUANG, Y.; LU, T. and CHOU, C. Ripening temperature affects the content and distribution of isoflavones in sufu, a fermented soybean curd. **International Journal of Food Science and Technology**, v 46, p. 257–262, 2011.
- HUANG, Y.; LAI, Y. and CHOU, C. Fermentation temperature affects the antioxidant activity of the enzyme-ripened sufu, an oriental traditional fermented product of soybean. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v 112, n 1, p. 49–53, 2011.

IBE, S.; KUMADA, K.; YOSHIBA, M.; ONGA, T. Production of natto which contains a high level of isoflavone aglycons. **Journal Nippon Shokuhin Kagaku Kogakukai**, Tsukuba, JAPON, v 48, no 1, p. 27-34, 2001.

IKEDA, Y.; IKI, M.; MORITA, A.; KAJITA, E.; KAGAMIMORI, S.; KAGAWA, Y.; e YONESHIMA, H. Intake of Fermented Soybeans, Natto, Is Associated with Reduced Bone Loss in Postmenopausal Women: Japanese Population-Based Osteoporosis (JPOS) Study. **American Society for Nutrition**, 2006.

INATSU, Y.; NAKAMURA, N.; YURIKO, Y.; FUSHIMI, T.; WATANASIRITUM, L. e KAWAMOTO, S. Characterization of *Bacillus subtilis* strains in Thua nao, a traditional fermented soybean food in northern Thailand. **Journal compilation, The Society for Applied Microbiology, Letters in Applied Microbiology**, v 43, p 237–242, 2006.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. v. 1: Métodos químicos e físicos para análise de alimentos, 3. ed. São Paulo: IMESP, p. 21-22. 1985.

ISHIHARA, M.; SINGH, H.; CHUNG, G.; TAM, C. Content composition and antioxidant activity of isoflavones in commercial and homemade soymilk and tofu. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v 87, Issue 15, p. 2844–2852, 2007.

ITO, Y; KIMURA, K. *Natto* bacteria take up polyglutamic acid. **Kagaku Seibutu**; v 44; p.569–572, 2006.

JUAN, M.; WU, C.; CHOU, C. Fermentation with *Bacillus* spp. as a bioprocess to enhance anthocyanin content, the angiotensin converting enzyme inhibitory effect, and the reducing activity of black soybeans. **Food Microbiology**. n 27, p. 918-923, 2010.

KADA, S.; YABUSAKI, M.; KAGA, T.; ASHIDA, H.; YOSHIDA, K. Identification of two major ammonia-releasing reactions involved in secondary natto fermentation. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. v. 72, p. 1869-1876, 2008.

KAIMOWITZ, D.; SMITH, J. Soybean technologies and the loss of natural vegetation in Brazil and Bolivia. In AGELSEN, A.; KAIMOWITZ, D. Ed. **Agricultural technologies and tropical deforestation**. CABI Publishing, p 195-211, 2001.

KANG, X.; ZHANG, Q.; WANG, S.; HUANG, X.; JIN, S. Effect of soy isoflavones on breast cancer recurrence and death for patients receiving adjuvant endocrine therapy. **Canadian Medical Association Journal**, v 182, n 17, p. 1857 – 1862, 2010.

KEINAN-BOKER, L.; PEETERS, P. H. M.; MULLIGAN, A. A.; NAVARRO, C.; SLIMANI, N.; MATTISSON, I.; LUNDIN, E.; MCTAGGART, A.; ALLEN, N. E.; OVERVAD, K.; TJØNNELAND, A.; CLAVELCHAPELON, F.; LINSEISEN, J.; HAFTENBERGER, M.; LAGIOU, P.; KALAPOTHAKI, V.; EVANGELISTA, A.; FRASCA, G.; BUENODEMESQUITA, H. B.; VAN DER SCHOUW, Y.T.; ENGESET, D.; SKEIE, G.; TORMO, M. J.; ARDANAZ, E.; CHARRONDIÈRE, U. R. and RIBOLI, E. Soy product consumption in 10 European countries: the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC) study. **Public Health Nutrition**, v 5, Issue 6, p. 1217 1226, 2002.

KIERS, J.L.; VAN IAEKEN, A.E.A.; ROMBOUTS, F.M.; NOUT, M.J.R. In vitro digestibility of *Bacillus* fermented soya bean. **International Journal of Food Microbiology**, v 60, p. 163–169, 2000.

KIMURA, A.; KUWAZAWA, S.; WADA, Y.; KYUTOKU, Y.; OKAMOTO, M.; YAMAGUCHI, Y.; MASUDA, T. and DAN, I. Conjoint Analysis on the Purchase Intent for Traditional Fermented Soy Product (Natto) among Japanese Housewives. **Journal of Food Science**, v 76, n 3, p. 217 – 224, 2011.

KIUCHI, K. Miso e Natto. Department of Food Science and Nutrition, Kyoritsu Women's University. **Food culture**, p. 07-10, 2001.

KIUCHI, K.; OHTA, T.; ITOH, H.; TAKABAYASHI, T.; EBINE, H. Studies of lipids of natto. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 24, p. 404-407, 1976.

KUMAR, V.; RANI, A. e CHAUHAN, G.S. **Nutritional Value of Soybean**. . In: SINGH, G. **The Soybean: Botany, Production and Uses**. Edited Department of Plant Breeding and Genetics Punjab Agricultural University Ludhiana, India, Ed CABI Publishing, p 375-404, 2010.

KUDOU, S.; SHIMOYAMADA, M.; IMURA, T.; UCHIDA, T.; OKUBO, K. A new isoflavone glycoside in soybean seeds (*Glycine max* Merrill), glycitein 7-O-beta-D-(6''-O-acetyl)-glucopyranoside. **Agricultural and biological Chemistry**, v.55, n.3, p.859-860, 1991.

KWON, D. Y.; DAILY III, J. W.; KIM, H. J. K.; PARK, S. Antidiabetic effects of fermented soybean products on type 2 diabetes. **Nutrition Research**, n 30 p. 1–13, 2010.

LIGGINS, J.; BLUCK, L. J.C.; RUNSWICK, S.; ATKINSON, C.; COWARD, W.A.; BINGHAM, S. A. Daidzein and genistein content of fruits and nuts. **The Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 11, p. 326-331, 2000.

LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W., SCHMIDELL, W. **Bioteconlogía Industrial: Processos Fermentativos e Enzimáticos**. São Paulo, SP, Ed. Edgard Blucher LTDA, v. 3, 593p., 2001

LIMA, V.M.G.; KRIEGER, N., MITCHELL, D.A.; BARATTI, J.C., FILLIPPIS, I.; FONTANA, J.D. Evaluation of the potential for use in biocatalysis of a lipase from a wild strain of *Bacillus megaterium*. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 31, p. 53–61, 2004 .

MARUO, B.; YOSHKAWA, H. Ed. 1989. Industrial application of *B subtilis*. Capítulo 8 em Topics in Secondary Metabolism I *Bacillus subtilis*: Molecular Biology and Industrial Application. Maruo, B. and Yoshkawa, H. Ed. New York: Elsevier Science Publishing Co. Inc. p. 143–161,1989.

MATSUMOTO, I.; AKIMOTO, T.; IMAI, S. Effects of temperature and inoculum size on natto's appearance number of *B natto* temperature hardness and color tone during fermentation. **J Japanese Society of Food Science and Technology**. v. 40, p.75–82, 1993.

MATSUURA, M.; OBATA, A.  $\beta$ -Glucosidases from soybeans hydrolyze daidzin and genistin. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 1, p. 144-147, 1993.

MESSINA, M. J.; PERSKY, V.; SETCHELL, K. D. R.; BARNES, S. Soy intake and cancer risk: A review of the in vitro and in vivo data. **Nutrition and Cancer**, v. 21, p. 113-131, 1994.

MESSINA, M. J.; LOPRINZI, C. L.. Soy for Breast Cancer Survivors: A Critical Review of the Literature. American Institute for Cancer Research 11th Annual Research Conference on Diet, Nutrition and Cancer. **The Journal of Nutrition**, v 131, n 11, 2001.

MESSINA, M. J. Soy and the Prevention and Treatment of Chronic Disease: a Short Review of the Literature. **American Soy Association Technical Bulletin**, v HN35, 2002.

MISSÃO, M. R. Soja: origem, classificação, utilização e uma visão abrangente do mercado. **Maringá Management: Revista de Ciências Empresariais**, v. 3, No1, p.7-15, 2006.

MITSUBOSHI, S.; SAITO, H.; MATSUKAWA, M.; MIYAJI, Y.; TANAKA, T.; MURAHASHI, A.; MURAMATSU, K.; WATANABE, S.; KIUSHI, K. Development of Soft, Sticky Itohiki-natto Manufactured for Senior Citizens. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi** v. 53, no. 9, p 466- 473, 2006. Em japonês.

MORAIS, A. A. C.; SILVA, A. L.; AMABILE, R. F. Histórico da soja. In: MORAIS, A. A. C., SILVA, A. L. (Ed.). Soja: suas aplicações. Rio de Janeiro: MEDSI, p. 1-12, 1996.

MORI, A. L. B. Solubilidade das proteínas de feijão comum envelhecido. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina – UEL, 78 p, 2001.

MUROOKA, Y. E YAMSHITA, M. **Traditional healthful fermented products of Japan. J Ind Microbiol Biotechnol**, v 35, p 791–798, 2008.

MYERS, R. H., MONTGOMERY, D. C. Response surface methodology: Process and product optimization using designed experimental, 2o ed, **Wiley**, 2002.

NAGATA, Y.; SONODA, T.; MORI, M.; MIYANAGA, N.; OKUMURA, K.; GOTO, K.; NAITO, S.; FUJIMOTO, K.; HIRAO, Y.; TAKAHASHI, A.; TSUKAMOTO, T.; AKAZA, H. Dietary Isoflavones May Protect against Prostate Cancer in Japanese Men. **American Society for Nutrition**, 2007.

NAKAJIMA, N.; NOZAKI, N.; ISHIHARA, K.; ISHIKAWA, A.; TSUJI, H. Analysis of isoflavone content in Tempeh, a fermented soybean, and preparation of a new isoflavone-enriched tempeh. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, p. 685-687, 2005.

NARUSE, W. The view of natto. Naruse Fermentation Laboratory Ltd. Nerima, Nerima- ku, Tokyo, Japan, 2006.

NOGUEIRA, A. C. L. Agricultura: O Agronegócio da Soja: Produção Nacional e Mercado Global. Análise de conjuntura de agronegócios. Fundação Instituto de Pesquisas Econômicas – FIPE, 2012. Acessado em: 05/11/2012.

OGUNTOYINBO, F. A.; SANNI, A. I.; FRANZ, C. M. A. P.; HOLZAPFEL, W. H. *In vitro* fermentation studies for selection and evaluation of *Bacillus* strains as starter cultures for the production of *okephe*, a traditional African fermented condiment. **International Journal of Food Microbiology**, p. 208-218, No 113, 2007.

OHTA T. Natto. Capítulo 5 em *Legume-based Fermented Foods* NR Reddy MD Pierson. D Merle, DK Salunkhe, CRC Press. p. 85-93, 1986.

OJOKOH, A. O. and YIMIN, W. Effect of Fermentation on Chemical Composition and Nutritional Quality of Extruded and Fermented Soya Products. **International Journal of Food Engineering**, v 7, n 4, Article 6, p. 1 – 16, 2011.

OKABE, Y.; SHIMAZU, T. and TANIMOTO, H. Higher bioavailability of isoflavones after a single ingestion of aglycone-rich fermented soybeans compared with glucoside-rich non-fermented soybeans in Japanese postmenopausal women. **Journal of Science Food and Agricultural**, n 91, p. 658–663, 2011.

OLIVEIRA, M. A.; PANIZZI, M. C. C.; MADARINO, J. M. G.; LEITE, R.S.; CAMPOS FILHO, P. J.; VICENTINI, M. B. Quantificação dos teores de açúcares, oligossacarídeos e amido em genótipos/ cultivares de soja (*Glycine Max* (L) Merril) especiais utilizados para alimentação humana. **Brazilian Journal of Food Technology**, v 13, n 1, p. 23-29, 2010.

OMAFUVBE, B. O.; SHONUKAN, O. O.; ABIOSE S. H. Microbiological and biochemical changes in the traditional fermentation of soybean for ‘soy-daddawa’ – Nigerian food condiment. **Food Microbiology**, no 17, p. 469-474, 2000.

OMAFUVBE, B. O.; FALADE, O. S.; OSUNTOGUN, B. A. and ADEWUSI, S. R. A. Chemical and Biochemical Changes in African Locust Bean (*Parkia biglobosa*) and Melon (*Citrullus vulgaris*) Seeds During Fermentation to Condiments. **Pakistan Journal of Nutrition**, v 3, n 3, p. 140 – 145, 2004

ONozAWA, M.; FUKUDA, K.; OHTANI, M.; AKAZA, H.; SUGIMURA, T. AND WAKABAYASHI, K. Effects of Soybean Isoflavones on Cell Growth and Apoptosis of the Human Prostatic Cancer Cell Line LNCaP. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v 28, n 6, 1998.

OUOBA, L.I.I.; RECHINGER, K.B.; BARKHOLT, V.; DIAWARA, B.; TRAORE, A.S. e JAKOBSEN, M. Degradation of proteins during the fermentation of African locust bean (*Parkia biglobosa*) by strains of *Bacillus subtilis* and *Bacillus pumilus* for production of Soumbala. **Journal of Applied Microbiology**, v 94, p. 396–402, 2003.

PAPALEO, V. T. **As propriedades da proteína de soja na alimentação humana.** Monografia de Especialização em Qualidade em Alimentos - Universidade de Brasília, Brasília, 58p., 2004.

PARANAÍBA, A. C.; ALVES, G. L. F.; WANDER, A. E. Benefícios Fiscais na Cadeia da Soja em Goiás: apropriação pela estrutura de intermediação. **Informações Econômicas**, SP, v 42, n 1, 2012.

- PARIS, L. D. **Produção de enzimas fúngicas por fermentação em estado sólido das sojas orgânicas, transgênicas e convencional.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química. Toledo, PR, 115 p. , 2008
- PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; NERY, I. A.; AGUIAR, C. L. AND PACHECO, T. A. R. C.. **Enrichment of Isoflavone Aglycones in Extracted Soybean Isoflavones by Heat and Fungal  $\beta$ -Glucosidase.** Department of Food Science, College of Food Engineering, State University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brasil. v. 34, no 4, ISSN 0257 – 2397, p. 14 – 19, 2001.
- PEDERSON, C. S.. **Microbiology of Food Fermentation.** Westport, Connecticut, 2nd Ed. AVI Pub Co. Inc, p. 236, 1971.
- PENHA, L. A. O.; FONSECA, I. C. B.; MANDARINO, J. M.; BENASSI, V. T. A soja como alimento: valor nutricional, benefícios para a saúde e cultivo orgânico. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 25, no 1, p. 91-102, 2007.
- PETER GOLBITZ. **Traditional Soyfoods: Processing and Products.** Soyatech, Inc., Bar Harbor, ME 04609. 0022-3166/95. American Institute of Nutrition. 1995. Disponível em: [http://jn.nutrition.org/content/125/3\\_Suppl/570S.full.pdf](http://jn.nutrition.org/content/125/3_Suppl/570S.full.pdf). Acessado em: 02/06/2011.
- PIAZZON-GOMES, J., PRUDÊNCIO, S. H., SILVA, R. S. S. F. Queijo tipo minas frescal com derivados de soja: características físicas, químicas e sensoriais. **Ciência Tecnologia Alimentos**, n 30 p.77-85, 2010.
- PYO, Y.; LEE, T.; LEE, Y.. Enrichment of bioactive isoflavones in soymilk fermented with  $\beta$ -glucosidase-producing lactic acid bacteria. **Food Research International**, no 38, p. 551 – 559, 2005.
- PROBST, A. H.; JUDD, R. W. Origin, U. S. history and development, and world distribution. In: CALDWELL, B.E. (ed.) Soybeans: improvement, production, and uses. Madison, American Society of agronomy, v. 16, p. 1-15, 1973.
- QIU, L. e CHANG, R.. **The Origin and History of Soybean.** In: SINGH, G. **The Soybean: Botany, Production and Uses.** Edited Department of Plant Breeding and Genetics Punjab Agricultural University Ludhiana, India, Ed CABI Publishing, p 1-24, 2010.
- RAGHUVANSHI, R.S.; SINGH, D.P. Preparation and use. In: Erskine, W., Muehlbauer F.J., Sarker A. and Sharma, B. The Lentil: Botany, Production and Uses. CAB International, Wallingford, UK, p. 408–424, 2009.
- REGER, D.L.; GOODE, S.R. e MERCER, E.E. Chemistry: Principles & Practice. Filadélfia: Saunders College Publishing, 950 p., 1993.
- REGITANO-D'ARCE, M. A. B. **Produtos protéicos de soja.** Em: OETTERER, M.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B.; SPOTO, M. H. F. (Ed.). Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos. Barueri: Manole, p.355-402, 2006.

REGITANO-D'ARCE, M. A. B. **Tecnologia da transformação**. Em: CÂMARA, G. M. S.; GODOY, O. P.; MARCOS-FILHO, J.; REGITANO-D'ARCE, M. A. B. (Ed.). Soja: produção, pré-processamento e transformação agroindustrial. São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia, p.53-99. (Série de Extensão Agroindustrial, 7), 1982.

RIBEIRO, M. L. L.; MANDARINO, J. M. G.; CARRÃO-PANIZZI, M. C.; OLIVEIRA, M. C. N.; CAMPO, C. B. H.; NEPOMUCENO, A. L.; IDA, E. I. Isoflavone content and  $\beta$ -glucosidase activity in soybean cultivars of different maturity groups. **Journal of Food Composition and Analysis**, n.20, p.19-24, 2007.

RIBEIRO, M. L. L. **Teor de isoflavonas e atividade de beta-glucosidase em grãos de soja germinada e de diferentes grupos de maturação. Purificação e caracterização bioquímica parcial de beta-glucosidase**. Tese apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado em Ciências de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina como requisito à obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos. Londrina, PR, 115 p., 2006.

ROSA, A. M.; CLAVISO, J.; PASSOS, L. M. L.; AGUIAR, C. L. Alimentos fermentados à base de soja (*Glycine max* (Merrill) L.): importância econômica, impacto na saúde e efeitos associados às isoflavonas e seus açúcares. **Revista brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v 7, n 4, p. 454-462, 2009.

ROSSI, E. A.; ROSIER, I.; DÂMASO, A. R.; CARLOS, I. Z.; VENDRAMINI, R. C.; ABDALLA, D. S.P.; TALARICO, V. H.; MINTO, D. F. Determinação de isoflavonas nas diversas etapas do processamento do “iogurte” de soja. **Alimentos e Nutrição**, v 15, n 2, p. 93-99, 2004.

RYU, Y.; WON, B.; PARK, H., GHAFOR, K.; PARK, J. Effects of the  $\beta$ -glycosidase reaction on bio-conversion of isoflavones and quality during tofu processing. **Journal of Science Food and Agricultural**, v. 90, p. 843–849, 2010.

SANTOS, A. B.; BACHA, C. J. C. A evolução da cultura e do processamento industrial da soja no Brasil – período de 1970 a 2002. **Teoria e Evidência Econômica**, v.11, n 20, p. 89-118, 2003.

SARKAR, P. K. ; TAMANG, J. P.; COOK, P. E. and OWENS, J.D. Kinema - a traditional soybean fermented food: proximate composition and microflora. **Food Microbiology**, v 11, p. 47- 55, 1994.

SCHMIDELL, W., LIMA, U.A., AQUARONE, E., BORZANI, W. **Biotechnologia Industrial: Engenharia Bioquímica**. São Paulo, SP, Ed. Edgard Blucher LTDA. v. 2. 541p., 2001.

SHANMUGASUNDARAM, S., S.-T. CHENG, M.-T. HUANG; M.-R. YAN. Varietal Improvement of Vegetable Soybean in Taiwan, in **Vegetable Soybean: Research Needs for Production and Quality Improvement**, edited by S. Shanmugasundaram, Asian Vegetable Research and Development Center, p. 30 – 42, 1991.

SHIH, M.; YANG, K. and KUO, S. Optimization Process of Black Soybean Natto Using Response Surface Methodology. **Journal of Food Science**, v 74, n 6, p. 294 – 301, 2009.

SHURTLEFF, W.; AOYAGI, A. **A Special Report on The History of Traditional Fermented Soyfoods.** A Chapter from the Unpublished Manuscript, *History of Soybeans and Soyfoods: 1100 B.C. to the 1980s*. Copyright 2007 Soyinfo Center, Lafayette, California. Disponível em: <http://temp.soyinfocenter.com/HSS/natto2.php>. Acessado em: 30/05/2011.

SILVA, J. B.; PRUDÊNCIO, S. H.; FELBERG, I.; DELIZA, R.; CARRÃO-PANIZZI M. C. Aceitabilidade de bebidas preparadas a partir de diferentes extratos hidrossolúveis de soja. **Pesquisas agropecuária brasileira**, v 42, n12, p.1779-1784, 2007.

SILVA, J. B.; CARRÃO-PANIZZI M. C.; PRUDÊNCIO, S. H. Chemical and physical composition of grain-type and food-type soybean for food processing. **Pesquisas agropecuária brasileira**, v 44, n 7, p. 777-784, 2009.

SILVA, L. H.; CELEGHINI, R. M. S. AND CHANG, Y. K. Effect of the fermentation of whole soybean flour on the conversion of isoflavones from glycosides to aglycones. **Food Chemistry**, v 128, p. 640–644, 2011.

SILVA, M. S.; NAVES, M. M. V.; OLIVEIRA, R. B.; LEITE, O. S. M. Composição Química e Valor proteico do resíduo de soja em relação ao Grão de soja. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v 26, n 3, p. 571-576, 2006.

STANDAL, B. R.. Nutritional value of proteins of Oriental soybean foods. **Journal of Nutrition**, v 81, p. 279-285, 1963.

STEINKRAUS, K. H. Indigenous fermented amino acid/peptide sauces and pastes with meatlike flavors: Chinese soy sauce Japanese shoyu Japanese miso southeast Asian fish sauces and pastes and related foods, seção 5 in *Handbook of Indigenous Fermented Foods Microbiology series*, v. 9 p. 530–547, 1983.

STEINKRAUS, K.H. Fermentations in World Food Processing. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v 1, p. 23 - 32, 2002.

SUGANO, M. **Nutritional Implications of soy.** In SUGANO, M. **Soy in health and disease prevention.** Published by CRC Press Taylor & Francis Group, p 1-16, 2006.

SUMI, H.; IKEDA, S.; OHSUGI, T. Increasing the production of nattokinase and vitamin K2 in Natto Dipicolinic Acid. **The Open Food Science Journal**, v.3, p. 10-14, 2009.

SUMI, H. e YATAGAI, C. **Fermented soybean components and disease prevention.** In SUGANO, M. **Soy in health and disease prevention.** Published by CRC Press Taylor & Francis Group, p 252-278, 2006

SUNAO, S. **Alimentos orientais.** In: AQUARONE, E.; SCHMIDELL, W.; LIMA, U. A. (Ed.). **Biotecnologia Industrial: biotecnologia na produção de alimentos.** São Paulo, SP, Ed Edgard Blücher LTDA, p. 465-489. 2001

SUZUKI, Y.; KONDO, K.; MATSUMOTO, Y.; ZHAO, B.; OTSUGURO, K.; MAEDA, T.; TSUKAMOTO, Y.; URANO, T.; UMEMURA, K. Dietary supplementation of fermented

soybean, natto, suppresses intimal thickening and modulates the lysis of mural thrombi after endothelial injury in rat femoral artery. **Life Sciences**, v. 73, p. 1289 – 1298, 2003.

Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos, Projeto Integrado de Composição de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas - USP e BRASILFOODS (Rede Brasileira de Dados de Composição de Alimentos). Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tabela/>, acessado em 20/03/2013.

TAIRA, H. Quality of soybean for processed foods in Japan. **JARQ**, n 24, p. 224-230, 1990.

TAKAHASHI, S.; KATSUMATA, R.; YOSHIZAWA, K.; YAMAKI, M.; OSAKO, M.; MURAKAMI, M.; MOURI, S.; SATO, M.; MEGURO, H.; KUBOKURA, H.; HIROSE, K.; TANAKA, T.; WATANABE, S.; KIUCHI, K. Soft Natto Manufactured with Starte of *Bacillus subtilis* KFP 843 Isolated from Douchi. **Nippon Shokuhin Kagaku Kogaku Kaishi**, v 52, n 10, p. 454 – 461, 2005. Em japonês.

TAMANG, J. P. Prospects of Asian Fermented Foods in Global Markets. P. 67 – 76, The 12th Asean Food Conference 2011, BITEC Bangna, Bangkok, Thailand, 2011.

TANAKA, T.; MURAMATSU, K.; KIM, H.; WATANABE, T.; TAKEYASU, M.; KANAI, Y.; KIUCHI, K. Composite of volatile compounds from Chungkuk-Jang and Itohiki-natto. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**. v. 62, p. 1440-1444, 1998.

TANIMOTO, H.; FOX, T.; EAGLES, J.; SATOH, H.; NOZAWA, H.; OKIYAMA, A.; MORINAGA, Y.; FAIRWEATHER-TAIT, S. J. Acute Effect of Poly- $\gamma$ -Glutamic Acid on Calcium Absorption in Post-Menopausal Women. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 26, no. 6, p. 645–649, 2007.

TODA, T.; UESUGI, T.; HIRAI, K.; NUKAYA, H.; TSUJI, K.; ISHIDA, H. New 6-O-acyl isoflavone glycosides from soybeans fermented with *Bacillus subtilis* (natto). I. 6-O-succinylated isoflavone glycosides and their preventive effects on bone loss in ovariectomized rats fed a calcium-deficient diet. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, n 22, v11, p.1193-1201, 1999.

TSANGALIS, D.; ASHTON, J.F.; MCGILL, A.E.J.; SHAH; N.P. Enzymic Transformation of Isoflavone Phytoestrogens in Soymilk by  $\beta$ -Glucosidase-Producing Bifidobacteria. **Journal of Food Science**, v. 67, p. 3104–3113, 2002.

TULEY L. Funcional foods-the technical issues. **Food manufacture**, v. 70, p. 30-32, 1995.

VIEIRA, C. R.; CABRAL, L. C.; PAULA, A. C. O. Composição Centesimal e Conteúdo de Aminoácidos, Ácidos graxos e Minerais de seis Cultivares de soja destinadas à alimentação Humana. **Pesquisas agropecuária brasileiras**, v 34, n 7, p.1277-1283, 1999.

VILLARES, A.; ROSTAGNO, M. A.; GARCÍA-LAFUENTE, A.; GUILLAMÓN, E.; MARTÍNEZ, J. A. Content and Profile of Isoflavones in Soy-Based Foods as a Function of the Production Process. **Food Bioprocess Technology**, n 4, p. 27–38, 2011.

- WANG, H.J. Quantification of potentially anticarcinogenic isoflavones in soy foods and the effect of processing on the composition of isoflavones. **Dissertation Abstracts Intern.**, B, v. 55, n. 7, 128p.1995.
- WEI, Q.; HALL, W.; CHANG, K.C. Natto characteristics as affected by steaming time, *Bacillus* strain, and fermentation time. **Journal of food science**, v 66, n 1, p. 167-173, 2001.
- WEI, Q.; CHANG, S. K.C. Characteristics of fermented natto products as affected by soybean cultivars. **Journal of Food Processing Preservation**, v 28, p. 251–273, 2004.
- WEI, Q.; CHEN, T. and CHEN, J. Use of *Bacillus subtilis* to enrich isoflavone aglycones in fermented natto. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n 88, p. 1007–1011, 2008.
- WENG, T. M. e CHEN, M. T.. Changes of Protein in Natto (a fermented soybean food) Affected by Fermenting Time. **Food Science and Technology**, v 16, n 6, p 537 – 542, 2010.
- WU, C. and CHOU, C. Enhancement of Aglycone, Vitamin K2 and Superoxide Dismutase Activity of Black Soybean through Fermentation with *Bacillus subtilis* BCRC 14715 at Different Temperatures. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v 57, n 22, p. 10695–10700, 2009.
- YAMAMOTO, T. **Soybean components and food for specified health uses (FOSHU)**. In SUGANO, M. **Soy in health and disease prevention**. Published by CRC Press Taylor & Francis Group, p 279-288, 2006
- YAN, L.; SPITZNAGEL, E. L. and BOSLAND, M. C. Soy Consumption and Colorectal Cancer Risk in Humans: A Meta-Analysis. **Cancer Epidemiol Biomarkers and Prevention**, v 19, p. 148-158, 2010.
- YOSHIARA L. Y.; MADEIRA T. B.; DELAROZA F.; SILVA J. B.; IDA E. I. Optimization of soy isoflavone extraction with different solvents using the simplex-centroid mixture design. Int. **Journal of Food Science and Nutrition** 2012. In Press. DOI: 10.3109/09637486.2012.690026, 2012.
- ZANGELMI, A. C. B; TAGLIOLATTO, M. A.; DIAS, E. L.; LANGE, D. A. Produtos de soja: leite, farinha e outros. **São Paulo: Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia**, 157 p., 1982.
- ZHU, Y.P.; FAN, J.F.; CHENG, Y.Q.; LI, L.T. Improvement of the antioxidant activity of Chinese traditional fermented okara (Meitauza) using *Bacillus subtilis* B2. **Food Control**, v 19, Issue 7, p. 654–661, 2008.

ANEXOS

ANEXOS SOMENTE NO TRABALHO IMPRESSO